

Resumen

El desarrollo de nuevos materiales en el campo de la biomedicina es un área del conocimiento en continua investigación. Sin embargo, uno de los principales problemas asociados a los materiales y dispositivos usados en la medicina reparativa y regenerativa es el problema de las infecciones bacterianas. En este sentido, el contar con nuevos materiales con capacidad de evitar estas infecciones representa un avance en el desarrollo de los biomateriales.

En este proyecto, se estudió la incorporación de compuestos hidrofílicos en andamios constituidos por hidrogeles de ácido poli(γ -glutámico) (PGGA), un polímero biodegradable, mediante la técnica de electrohilado (*electrospinning*). Estas nuevas matrices de hidrogel fueron diseñadas como agentes liberadores de drogas para promover la aplicación de los bacteriófagos como agentes antibacterianos.

Con un proceso de electrohilado, se elaboraron nanofibras de PGGA. Se han estudiado y optimizado todos los parámetros de control para el electrohilado de esta disolución de polímero (solvente, tiempo de disolución, concentración de polímero, flujo, etc.). Las nanofibras obtenidas se analizaron mediante microscopia óptica y microscopia electrónica de barrido para determinar su morfología y sus diámetros. En otra fase, las nanofibras de PGGA fueron entrecruzadas, mediante una reacción de reticulación, para conformar un hidrogel estable cuando la matriz se encuentre en medio acuoso. Se ha determinado el procedimiento óptimo de reacción (tiempo de reacción, solventes). Los hidrogeles obtenidos fueron caracterizados de diversas maneras: diámetros de fibras, tasa de hinchamiento, propiedades térmicas, solubilidad, y capacidad de degradación, entre otras. Finalmente, estos hidrogeles fueron cargados con la droga antibacteriana clorhexidina (CHX) y su polímero poli(hexametenbiguanida) (PHMB) para estudiar su liberación en diferentes medios. Además, se cargaron con bacteriófagos, virus específicos contra las bacterias *Staphylococcus Aureus*, los cuales fueron usados como agentes antibacterianos. Se realizaron también estudios de biocompatibilidad *in-vitro* de los hidrogeles preparados a partir de las nanofibras producidos, con el objetivo de determinar su comportamiento como matrices tridimensionales para la adhesión y proliferación celular.

Los resultados demuestran que los hidrogeles de PGGA tienen una capacidad de encapsulación de biofármacos CHX y PHMB. Además, se han demostrado que los bacteriófagos pueden ser incorporados en los hidrogeles de polímeros biodegradables y mantienen su actividad biológica. Por fin, se reveló que los hidrogeles dan una viabilidad celular. El desarrollo de estas nuevas matrices significa un avance prometedor para su uso como material biomédico para el control de infecciones bacterianas.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	2
GLOSARIO	5
1. PREFACIO	7
1.1. Origen del proyecto.....	7
1.2. Motivación.....	8
1.3. Requisitos previos.....	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo general del proyecto	9
2.2. Objetivos específicos del proyecto	9
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1. Polímeros biodegradables	10
3.1.1. Generalidades.....	10
3.1.2. Proceso de biodegradación	11
3.1.3. Aplicaciones.....	12
3.2. Acido poli(γ -glutámico)	14
3.2.1. Producción.....	14
3.2.2. Propiedades.....	15
3.2.3. Aplicaciones.....	16
3.3. Nanofibras.....	18
3.3.1. Definición	18
3.3.2. Obtención	19
3.3.3. Propiedades.....	19
3.3.4. Aplicaciones.....	19
3.4. Electrohilado (<i>Electrospinning</i>)	20
3.4.1. Principios de la técnica	21
3.4.2. Parámetros del proceso	23
3.4.3. Historia del electrospinning	24
3.5. Bacteriófagos	25
3.5.1. Fundamentos teóricos	26
3.5.2. Bacteriófagos versus antibióticos.....	28



3.5.3. Bacteriófagos: biofármacos.....	29
3.5.3.1. Clorhexidina digluconato	29
3.5.3.2. Poli(hexametilenbiguanida)	30
3.6. Antecedentes bibliográficos	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1. Material.....	33
4.1.1. Reactivos químicos	33
4.1.2. Disolventes	33
4.1.3. Material de laboratorio	33
4.1.4. Equipos de laboratorio	34
4.2. Generación de nanofibras del PGGA.....	35
4.2.1. Preparación de la disolución polimérica de PGGA.....	35
4.2.2. Electrospinning	36
4.2.2.1. Pruebas de electrospinning de las diferentes disoluciones poliméricas	37
4.2.2.2. Determinación de los parámetros óptimos del proceso.....	37
4.3. Proceso de entrecruzamiento químico: reticulación.....	39
4.3.1. Mecanismo reacción química.....	40
4.3.2. Procedimiento óptimo	43
4.4. Ensayos de degradación de los hidrogeles.....	45
4.5. Ensayos biológicos.....	46
4.5.1. Carga de bacteriófagos y su liberación, en bacterias, desde el hidrogel.....	46
4.5.2. Carga de biofármacos y su liberación desde el hidrogel.....	46
4.5.3. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar	47
4.5.4. Adhesión y proliferación celular	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1. Preparación de nanofibras del PGGA.....	49
5.1.1. Determinación del solvente óptimo para obtener una disolución de PGGA	49
5.1.2. Determinación de los parámetros óptimos para el electrohilado	51
5.2. Caracterización de las fibras	58
5.2.1. Morfología	58
5.2.2. Diámetro de las fibras	59
5.2.3. Ángulo de contacto	60
5.3. Determinación del proceso óptimo de reacción de reticulación	61
5.4. Caracterización de los hidrogeles obtenidos.....	68
5.4.1. Tasa de hinchamiento.....	68

5.4.2.	Morfología y diámetro de las fibras de los hidrogeles	70
5.4.3.	Angulo de contacto	77
5.4.4.	Análisis térmico.....	78
5.4.5.	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	80
5.4.6.	Solubilidad de los hidrogeles.....	81
5.4.7.	Degradación de los hidrogeles.....	82
5.5.	Ensayos biológicos	83
5.5.1.	Liberación de bacteriófagos Fersisi desde el hidrogel.....	83
5.5.2.	Liberación de drogas desde el hidrogel	85
5.5.3.	Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar	89
5.5.4.	Adhesión celular	90
6.	CONCLUSIONES	93
7.	ESTUDIO DE SOSTENIBILIDAD DEL PROYECTO	95
7.1.	Impacto ambiental.....	95
7.2.	Evaluación económica	96
7.2.1.	Coste de reactivos y disolventes.....	97
7.2.2.	Coste de los equipos de laboratorio.....	97
7.2.3.	Coste personal.....	98
7.2.4.	Coste total del proyecto	99
AGRADECIMIENTOS		100
BIBLIOGRAFÍA.....		101



Glosario

%E	Porcentaje de entrecruzamiento de las nanofibras en la reacción de reticulación para formar un hidrogel
\varnothing	Diámetro
TFA	Acido trifloro acético
C	Concentración polimérica de PGGa en TFA puro
CHX	Clorhexidina digluconato
Cistamina	2,2'-Diaminodiethyl disulfide dihydrochloride
d	Distancia entre la aguja y el colector en el electrospinning
DCM	Diclorometano
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
EDC	1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier
F	Flujo de salida de la solución polimérica de la aguja en el electrospinning
HFIP	Hexafluoro Isopropanol
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
MetOH	Metanol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
OM	Microscopia Óptica
P _h	Peso húmedo del hidrogel después del lavado en agua

P _s	Peso seco del hidrogel después de la hidrofiliación
PBS	Tampón fosfato salino
PGGA	Acido poli (γ -glutámico)
PHMB	Poli(hexametenbiguanida)
SEM	Microscopía electrónica de barrido
T _f	Temperatura de fusión
T _g	Temperatura de transición vítrea
t _d	Tiempo de disolución polimérica del PGGA en el TFA puro
TFA	Acido trifluoro acético
TGA	Análisis Termogravimétrico
t _r	Tiempo de reacción de reticulación en la solución de cistamina
UV	Espectroscopia de Ultravioleta-Visible (UV-Vis)
XPS	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X



1. Prefacio

1.1. Origen del proyecto

El desarrollo de nuevos materiales en el campo de la biomedicina es un área del conocimiento en continua investigación; la medicina reparativa y la regeneración de tejidos han de propiciar la mejora de la salud humana cuando su intervención se requiera. Así, en la actualidad es totalmente aceptado que para ello se requiere el concierto de diferentes áreas de conocimiento desde las ciencias básicas (p.e. biología, física, química, etc.) hasta las áreas con mayor aplicación como lo son las ingenierías (p.e. ingeniería mecánica, ingeniería química, informática, etc), y esta convergencia en algunos casos han derivado a nuevas líneas de conocimiento con objetivos propios, tal es el caso de la ingeniería biomédica, ingeniería biotecnológica, etc.

En este proyecto se pretende desarrollar una matriz de nanofibras obtenidas por la técnica de electrohilado o electrospinning a partir de un polímero biodegradable tal como el ácido poli(γ -glutámico) (PGGA), las cuales serán entrecruzadas para conformar un hidrogel estable cuando la matriz se encuentre en medio acuoso. Estos hidrogeles serán cargados con la droga antibacteriana clorhexidina y con su polímero poli(hexametilenbiguanida). Además, serán cargados con bacteriófagos, virus específicos de bacterias, los cuales serán usados como agentes antibacterianos. En este sentido, estas nuevas matrices de hidrogel serán diseñadas como agentes liberadores de drogas.

El por qué de la necesidad de desarrollar estos nuevos materiales se debe explicar por el hecho que uno de los principales problemas asociados a los materiales y dispositivos usados en la medicina reparativa y regenerativa es el problema de las infecciones bacterianas. En este sentido, el contar con nuevos materiales con capacidad de evitar las infecciones bacterianas representa un avance en el desarrollo de los biomateriales. Por otro lado, el cargar estos materiales con los bacteriófagos representa un avance en la lucha antimicrobiana. Uno de los mayores problemas asociados al uso de antimicrobianos es la resistencia antimicrobiana, es decir, las bacterias se han transformado en microorganismos resistentes a muchos antibióticos aplicados en la actualidad para su tratamiento y eliminación. A este aspecto de resistencia antimicrobiana ha contribuido el excesivo uso y abuso de sustancias antimicrobianas, así como su mal uso (p.e., el tratamiento con dosis subletales, o aplicación en casos de infecciones virales, etc.). Así, en este proyecto se pretende promover la aplicación de los bacteriófagos como agentes antibacterianos, los cuales en la actualidad vienen siendo redescubiertos en el mundo occidental como alternativa al uso de antibióticos.

1.2. Motivación

La principal motivación para la realización de este Proyecto Final de Máster fue avanzar en materia de investigación de biopolímeros, teniendo en cuenta que actualmente constituye un tema ampliamente estudiado con numerosas aplicaciones en la vida cotidiana tales como la medicina, la agricultura, los embalajes, etc. Por otra parte, realizar un trabajo de investigación en un laboratorio es una experiencia muy enriquecedora para mi proyecto profesional, ya que, además de, desarrollar mis capacidades de análisis y reflexión me permite aprender diferentes técnicas de laboratorio.

Adicionalmente, el hecho de que la transformación de los polímeros biodegradables mediante la técnica del electrohilado fuera una aplicación directa y actual en el ámbito de la biomedicina, me motivó fuertemente para realizar este trabajo. De manera que, mediante este proyecto, se deseaba contribuir de alguna forma al avance de nuevas líneas de estudio para el desarrollo tecnológico de la biomedicina.

Finalmente, una de las motivaciones más importantes durante el proyecto fue obtener un compuesto que pudiera remplazar el uso de antibióticos clásicos, ya que, como es sabido, los antibióticos son responsables de diferentes problemas de salud como: el desequilibrio de la flora intestinal, los trastornos digestivos, la micosis y otras infecciones secundarias.

1.3. Requisitos previos

Como requisitos previos para la ejecución de este proyecto se puede considerar la realización de diversas asignaturas de polímeros y biopolímeros del Master de Ingeniería Química de la UPC. Estos pueden ser considerados como la base formativa para la ejecución del proyecto.

Además, del interés personal por el trabajo experimental en el área de los polímeros y biopolímeros, también se puede considerar el deseo de trabajar en un grupo multidisciplinario.

Formalmente, el proyecto ha considerado un estudio bibliográfico previo sobre el estado del arte de las matrices de fibras del poli(γ -glutámico), incluyendo la revisión sobre los métodos de entrecruzamiento de las fibras.



2. Objetivos

2.1. Objetivo general del proyecto

Este proyecto tiene como objetivo general estudiar la conformación de matrices de nanofibras del ácido poli(γ -glutámico) entrecruzadas covalentemente. Esta conformación permitirá que las matrices se comporten como hidrogeles estables, y permitirá que sean cargadas en disoluciones de drogas antibacterianas, tal como, la clorhexidina y el poli(hexametilenbiguanida). Además, serán cargadas con un coctel de bacteriófagos específicos contra las bacterias *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus*.

2.2. Objetivos específicos del proyecto

1) En una primera fase, se seleccionaran los parámetros operacionales (campo eléctrico aplicado, velocidad de flujo y distancia aguja-colector) junto con las características de la disolución (solvente, concentración de polímero y tiempo de disolución) para efectuar el electrohilado del ácido poli (γ -glutámico) (PGGA) y poder generar nanofibras.

2) En una segunda fase, los distintos scaffolds se someterán a un proceso de entrecruzamiento químico aprovechando los grupos funcionales (-COOH) del PGGA. De esta forma las fibras de PGGA tendrán características de hidrogel, es decir, serán insolubles en agua pero presentarán una gran capacidad de absorberla. Estas matrices serán evaluadas por microscopía electrónica de barrido para determinar el diámetro de las fibras. Se establecerá el grado de hinchamiento de las matrices.

3) Desde un punto de vista de aplicación se incorporaran compuestos activos de elevada hidrofobicidad en el hidrogel resultante. Para ello, se ha seleccionado un biocida antimicrobiano de amplia aplicación en productos de aseo personal, tal como, la clorhexidina. Además, se cargara un polímero derivado de la clorhexidina, el poli(hexametilenbiguanida) o cosmocil™ (PHMB). La carga de ambos compuestos en las matrices serán evaluados por su actividad antibacteriana.

4) Otro objetivo planteado para el diseño de estas nuevas matrices es la carga con bacteriófagos de forma que se genere un scaffold con una actividad bactericida específica que pueda substituir la utilización de antibióticos convencionales.

En general, el desarrollo del proyecto requerirá la utilización de diversas técnicas como son las espectroscopias de UV-Vis, FTIR, microscopías óptica (OM), SEM, DSC, XPS, y TGA entre otras. Se requerirá también ensayos de adhesión y crecimiento bacteriano.

3. Introducción

3.1. Polímeros biodegradables

Un polímero es una macromolécula formada por unidades constitucionales repetitivas (UCR) a lo largo de la cadena polimérica de una manera más o menos ordenada. La unión entre sí de estas pequeñas moléculas o monómeros constituye el proceso químico conocido como polimerización. Para que una molécula pueda generar un polímero, es necesario que su funcionalidad sea igual o superior a dos, es decir que tenga dos o más grupos funcionales que puedan reaccionar. **[1]** El número de unidades monoméricas que componen la cadena polimérica corresponde al grado de polimerización. Si los polímeros están constituidos por un mismo tipo de monómero, se denominan homopolímeros, mientras que si contienen distintos tipos de monómeros son copolímeros.

Por la estructura de la cadena, los polímeros pueden ser clasificados en lineales, ramificados, o reticulados. Por su origen, los polímeros pueden clasificarse como naturales o sintéticos. También, se pueden clasificar como biodegradables o no biodegradables, en función de su ciclo de vida.

En este apartado, se describen las características de los polímeros biodegradables y sus aplicaciones. Particularmente, el ácido poli (γ -glutámico) (PGGA) por ser estudiado en este proyecto.

3.1.1. Generalidades

El uso creciente e indiscriminado de plásticos sintéticos no biodegradables, que además tienen una vida útil muy corta, ha propiciado la aparición de un problema medioambiental relativo a sus residuos contaminantes y al tiempo de su degradación. Por ejemplo, un chicle tarda hasta 5 años en degradarse; las colillas de cigarrillos que comúnmente se tiran al suelo, pueden tardar hasta 2 años en eliminarse. El gran problema que se está intentando solucionar desde hace unos años, son las bolsas de plástico porque tardan hasta 150 años en eliminarse, y provocan daños a la vida silvestre (flora y fauna). Así, estos ejemplos nos hacen reflexionar en la importancia del reciclaje y en la gran aplicabilidad de los plásticos biodegradables. En efecto, estos materiales tienen un tiempo muy corto de descomposición para producir sustancias útiles y reutilizables para crear nuevos productos o simplemente reintegrarse en la naturaleza, sin ningún efecto negativo.



3.1.2. Proceso de biodegradación

El término de *biodegradabilidad* fue definido de forma general por Chandra y Rustgi [2] como *un proceso por el cual bacterias, hongos, levaduras y sus enzimas consumen una sustancia polimérica como una fuente de alimento de manera que su forma original se ve alterada*. La biodegradación es un proceso relativamente rápido bajo las condiciones apropiadas de humedad, pH, temperatura y oxígeno disponible. El principal requisito de los polímeros biodegradables es que contengan grupos lábiles en sus cadenas que puedan romperse fácilmente por acción de un agente externo de naturaleza física o química. Estos grupos lábiles deben contener enlaces hidrolíticamente inestables, como por ejemplo, los que se hallan presentes en los grupos éster, anhídrido, amida, etc.

Los factores que determinan la tasa de biodegradación de un polímero pueden ser de tres tipos:

- Factores medioambientales del medio ambiental: temperatura, pH y humedad.
- Características químicas del polímero: peso molecular, estereoquímica o estereoconfiguración, hidrofobicidad, hidrólisis.
- Características físicas del polímero: cristalinidad, temperatura de transición vítrea, rugosidad y forma.

En general, el proceso de biodegradación suele tener lugar en dos etapas:

1. Primero, ocurre la rotura de la cadena polimérica mediante la acción de microorganismos, fotodegradación, oxidación o hidrólisis. Esto ocurre en el mecanismo de polimerización que ha originado el polímero.
2. Segundo, los fragmentos del polímero son asimilados por los microorganismos correspondientes, dando como productos de reacción dióxido de carbono y agua (mineralización). Opcionalmente, los fragmentos de polímeros pueden ser incorporados por los microorganismos y organismos superiores (p.e., peces, invertebrados, etc) sin sufrir mineralización (bioacumulación).

Se puede esquematizar el proceso de biodegradación así:

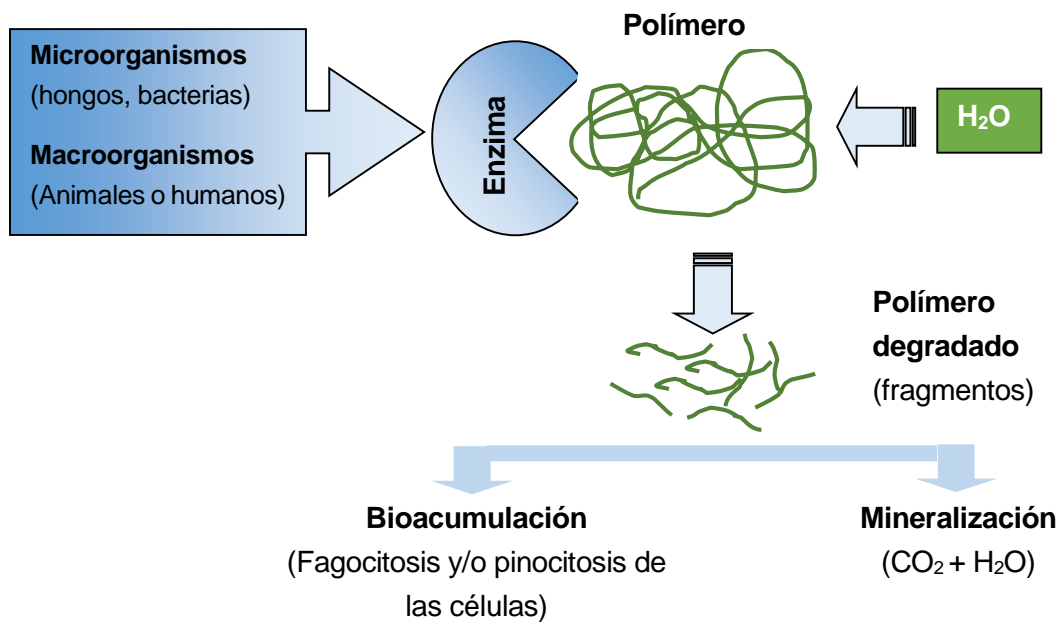


Fig. 3.1. Esquema del proceso de degradación de los polímeros biodegradables

3.1.3. Aplicaciones

Las aplicaciones de los polímeros biodegradables se han centrado principalmente en tres áreas principales: biomédica, agrícola y embalaje de bienes de consumo. Debido a su mayor especialización y valor unitario, las aplicaciones de los polímeros biodegradables para el desarrollo de dispositivos biomédicos se ha realizado más rápidamente en comparación a las otras dos áreas. [2]

Aplicaciones en biomedicina:

Los plásticos biodegradables se han desarrollado como implantes quirúrgicos en cirugía vascular y ortopédica, como matrices implantables, para la liberación controlada de fármacos, como suturas quirúrgicas absorbibles, y para el uso en cirugía ocular. El término biomaterial se refiere a un material sintético usado en aplicaciones de dispositivos biomédicos cuyo objetivo es la interacción con un sistema biológico. Además, es importante definir la biocompatibilidad, que trata de estudiar como el tejido reacciona con materiales extraños. Un material es biocompatible cuando es inerte para que el organismo hospedero reaccione adversamente a su presencia en el organismo. En general, los biomateriales son utilizados para los siguientes fines biomédicos:



- Para reemplazar los tejidos enfermos o no-funcional, como por ejemplo, las válvulas cardíacas artificiales y arterias o la reconstrucción de dientes y lentes intraoculares.
- Para ayudar en la reparación del tejido, incluyendo las suturas y fracturas óseas, ligamentos y dispositivos de reparación de los tendones.
- Para reemplazar toda o una parte de la función de los órganos principales, tales como en la oxigenación (pulmones), perfusión (hígado), y la administración de insulina (páncreas).
- Para suministrar fármacos en el interior del cuerpo, ya sea a sitios específicos (por ejemplo, directamente a un tumor) o para el suministro de fármacos y/o drogas con tasas sostenidas (p.e., insulina, pilocarpina, anticonceptivos, etc). [2]

Aplicaciones en agricultura:

Las aplicaciones de los polímeros en la agricultura han crecido a una velocidad enorme desde la introducción de las películas de plástico en los años 1930 y 1940 para su uso como coberturas o cortinas para producir el efecto invernadero, y en la fumigación. Actualmente, todas las clases de polímeros, es decir, plásticos, recubrimientos, elastómeros, fibras y polímeros solubles en agua se utilizan en aplicaciones que incluyen la liberación controlada de pesticidas y nutrientes, el acondicionamiento del suelo, recubrimientos de semillas, plantaciones de gel, protección de plantas. Sin embargo, los plásticos degradables son también de interés como coberturas agrícolas y recipientes de plantación agrícolas. En último caso, la biodegradabilidad, como en compostaje, también tiene interés, ya que permitiría la combinación de plásticos degradables con otros materiales biodegradables para su transformación en materiales útiles para mejorar el suelo. [2]

Aplicaciones en los embalajes:

Las características de los polímeros de embalaje están influenciadas en gran medida por las condiciones de la estructura química, del peso molecular, de la cristalinidad y del procesamiento de los polímeros utilizados. Las características físicas requeridas en el envasado dependen del artículo que será empaquetado, así como del entorno en el que se almacena el paquete. Los productos que deben mantenerse congelados durante un periodo de tiempo requieren un embalaje especial. Los artículos alimentarios requieren condiciones de envasado más estrictas en comparación a los bienes no perecederos.

El reto en el desarrollo de envases biodegradables será combinar polímeros que son verdaderamente biodegradables y conformarlos en una capa muy fina o lámina, o en una mezcla de capas (multicapas) y que tengan propiedades tan buenas como las que se

encuentran con los laminados sintéticos. [2]

3.2. Acido poli(γ -glutámico)

El ácido poli(γ -glutámico) (PGGA) es un biopolímero natural constituido de unidades repetitivas de ácido L-glutámico, ácido D-glutámico o de ambos. El PGGA puede presentar diferentes propiedades tales como su estado conformacional, propiedades enantioméricas y de peso molecular. El PGGA tiene muchas aplicaciones sobre todo en medicina, y esto se debe a su biodegradabilidad, no-toxicidad y a sus propiedades no-inmunogénica (no provoca una respuesta inmunitaria),

El PGGA fue descubierto por Ivonovics y Brucker en 1937 cuando una capsula de *Bacillus Anthracis* fue liberado en un medio autoclavado.

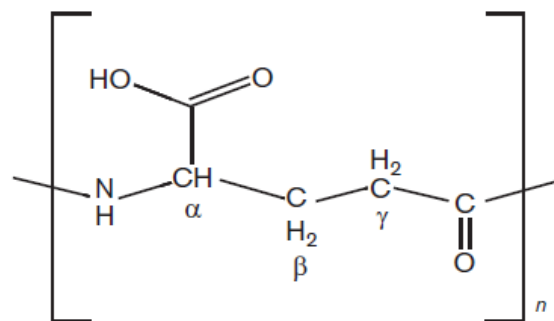


Fig. 3.2. Estructura química del PGGA [3]

3.2.1. Producción

PGGA es producido principalmente en fermentación bacteriana usando bacterias de tipo *Bacillus*.

Cuando el ácido poli(α -glutámico) es producido sintéticamente, el producto tiene un peso molecular bajo de 10 kDa y esto limita sus aplicaciones. Sin embargo, cuando el ácido poli(γ -glutámico) (PGGA) es producido con bacterias, tiene un peso molecular mayor a 10 kDa y generalmente oscila de 100 hasta más de 1000 kDa.

El polímero PGGA que se ha utilizado en este proyecto fue producido por *Bacillus Subtilis*



aislado desde el chungkookjang, una tradicional haba coreana de soja fermentada. De esta manera, el polímero PGGA obtenido tiene un peso molecular mucho más alto que el del polímero comúnmente producido por *Bacillus natto*.

3.2.2. Propiedades

El PGGA tiene diferentes composición enantioméricas. Estas composiciones determinan como el PGGA fue producido durante su fermentación. Si el PGGA contiene solo los enantiómeros L o D, el polímero se disuelve en etanol. Sin embargo, si el polímero contiene los dos enantiómeros en proporciones equimolares, precipita en etanol.

El PGGA natural tiene un peso molecular de más de 1 millón de kDa y generalmente contiene casi una cantidad igual de unidades D y L. [5]

El PGGA puede ser diferenciado entre dos isoformas, α -PGA y γ -PGA (PGGA), dependiendo del enlace del grupo carboxilo al carbono.



Fig. 3.3. Diferencia en la estructura química entre el α -PGA (izquierda) y el γ -PGA (PGGA) (derecha)

El PGGA puede existir de dos formas: una forma con el grupo ácido libre que tiene una baja solubilidad en agua. La otra, de tipo sal de sodio, en la que el grupo ácido tiene un catión Na^+ , y es totalmente soluble en agua.

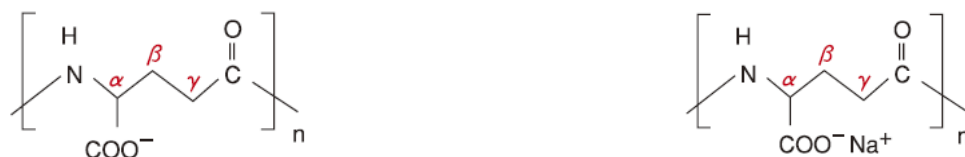


Fig. 3.4. Diferencia en la estructura química de las dos formas de PGGA: la forma libre de ácido (izquierda) y sal de sodio (derecha) [4]

La forma del polímero con el grupo ácido libre es adecuada para realizar reacciones de

entrecruzamiento, y corresponde a la forma del polímero que hemos utilizado en este proyecto.

Existe también dos tipos de PGGA, uno de bajo peso molecular (200,000 – 500,000 g/mol) y uno de alto peso molecular (1'500,000 – 2'500,000 g/mol). Para el PGGA se sabe que cuando más bajo sea el peso molecular, el polímero será más soluble en agua. El PGGA puede absorber agua en una proporción de 5000 veces más que su propio peso. Así, cuando mayor es el peso molecular, más alta será la retención de agua.

Se puede observar en la Fig. 3.5 el espectro H^1 -RMN del PGGA, donde aparecen tres picos correspondientes a las tres familias de hidrógenos que hay en el polímero PGGA. A 4,026 ppm aparece un triplete originado por los α -CH (1H); a 2,26 ppm aparece un triplete atribuido a los γ -CH₂ (2H); y finalmente entre 1,963-1,866 ppm aparece el doblete de triplete de los β -CH₂ (3H).

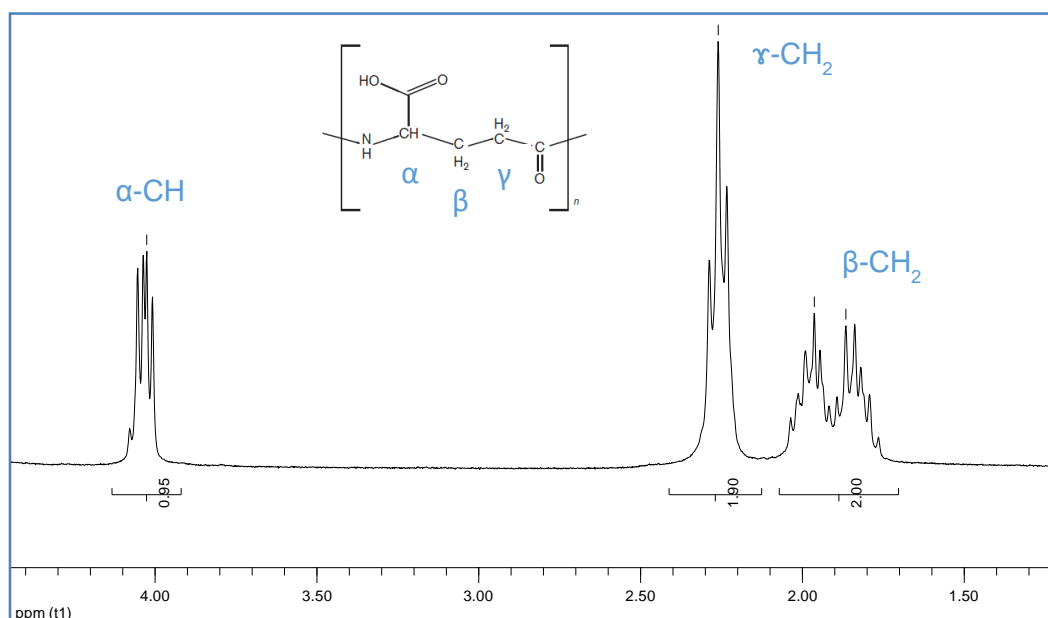


Fig. 3.5. Espectro H^1 RMN del polímero PGGA

3.2.3. Aplicaciones

El PGGA es una sustancia muy importante que ha sido explotada en diversas aplicaciones debido a sus propiedades únicas. Es un polímero biodegradable, comestible y no-toxico para



los humanos.

Las principales aplicaciones del PGGA son encontradas en el área de la biomedicina. Por ejemplo, puede servir como portador o liberador de drogas. En efecto, El PGGA unido covalentemente a la cisplatina (una droga citotóxica contra el cáncer), ha demostrado reducir la toxicidad de la cisplatina de manera eficiente, mientras que la cisplatina disminuye el tamaño de tumores de mama humana mediante su implantación en ratones desnudos. El PGGA es utilizado también en la ingeniería de tejidos debido a sus propiedades hidrofóbicas y a su citocompatibilidad. Igualmente, el PGGA puede ser utilizado en la liberación de genes. En efecto, un complejo de ADN/poliethylenimine/PGGA fue desarrollado y utilizado para liberar genes, estos complejos demostraron una muy alta capacidad de transfección y muy baja toxicidad.

El PGGA también tiene otras aplicaciones, tal como en el tratamiento de aguas residuales. En efecto, el PGGA es un biopolímero floculante y permite formar floculos con los compuestos orgánicos o inorgánicos que están presentes en el agua residual.

Además, el PGGA es muy utilizado en la industria alimentaria como, por ejemplo, suplemento alimentario. Por ejemplo, el mucílago de natto (guisante de soja fermentada) que contiene PGGA mejora mucho la solubilidad del calcio in-vitro e in-vivo en las ratas que recibieron este alimento, además se mejoró el contenido de calcio en sus huesos. También es interesante el hecho que el PGGA puede mejorar la textura de los alimentos. En efecto, la adición de PGGA al pan de trigo reduce su dureza durante su almacenamiento.

Este polímero (PGGA) es también utilizado en la industria cosmética. El PGGA mejora la calidad de los productos de cuidado de la piel y del cabello, y también tiene propiedades exfoliante, hidratante y alisado de arrugas.

Asimismo, el PGGA es aplicado en la agricultura como agente para el biocontrol del cultivo de pepinos, mejorando su valor nutritivo y consumo.

Por último, el PGGA tiene aplicaciones en la industria de los plásticos biodegradables. Los esteres derivados del PGGA han demostrado gran capacidad para formar fibras y films biodegradables, de este modo pueden ser aplicados como sustituyentes de los polímeros no-biodegradables.

3.3. Nanofibras

3.3.1. Definición

Aún no existe una definición establecida para las nanofibras, pero ellas podrían ser caracterizadas por un diámetro menor a 100 nm, y con una relación diámetro/longitud mayor a 100.

La tecnología de las nanofibras es un área que atrae la atención de muchas ramas de investigación. Las nanofibras proporcionan conexiones entre la escala nano y el macrométrica debido a que sus diámetros son del orden de nanómetros, mientras que sus longitudes pueden ser de cientos de metros o mayores.

Existen diferentes formas de fibras. Pueden ser de formas bidimensionales o también de forma tridimensional, esto depende de la forma del colector de fibras. También, se pueden tener diferentes estructuras, tales como las representadas en las siguientes imágenes (ver Fig. 3.6).

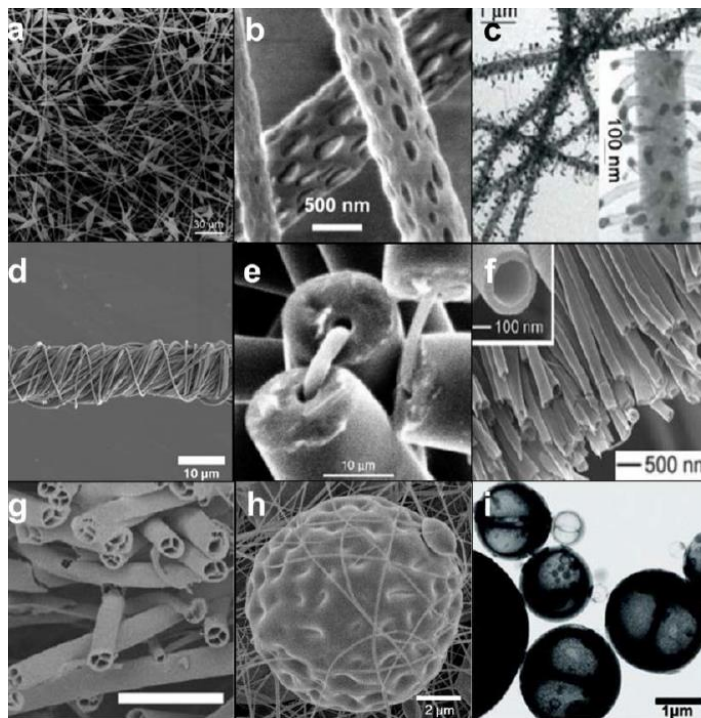


Fig. 3.6. Diferentes estructuras de nanofibras: a) Fibras como perlas de collar, b) Fibras altamente porosa, c) Fibras injertadas, d) Un haz de cuerda micro electropun, e) Fibras de cable-en-tubo, f) Microtubos alineados, g) Tubos multicanales, h)



Esferas similar a bolas de golf, i) Esferas de cámaras múltiples.

3.3.2. Obtención

Existen tres técnicas utilizadas para obtener nanofibras: el electrospinning de un polímero, el auto-ensamblaje, y la separación de fases. Sin embargo, el electrospinning es la técnica más estudiada, y también muestra los resultados más prometedores en términos de aplicaciones de ingeniería de tejidos. [6] En los siguientes apartados se detallan diversos aspectos de la técnica del electrospinning.

3.3.3. Propiedades

En comparación con las fibras convencionales, las nanofibras ofrecen numerosas ventajas: mayor área de superficie, tamaño de poro más pequeño y mayor volumen de poros o mayor porosidad. Estas características son importantes y se aplican a muchas innovaciones que incluyen el cierre de heridas, la filtración, nuevas cremas cosméticas y la bioelectrónica.

3.3.4. Aplicaciones

Actualmente, las nanofibras son utilizadas en diferentes áreas:

- El cuidado de la salud: administración dirigida de fármacos, articulaciones artificiales, reemplazos de tejidos.
- La industria química: nanotubos, nano compuestos, cremas cosméticas.
- La industria textil: novedosas prendas de vestir, tejidos hidrófobos y que no se ensucian.
- El medio ambiente: filtración, biodegradación, eliminación de impurezas, envasado de alimentos.
- El electrónico: dispositivos de almacenamiento, bioelectrónica, la electrónica cuántica.

Las nanofibras constituyen un material muy interesante para aplicaciones en biomedicina por muchas razones. En comparación con la mayoría de los materiales, la mayor área de la superficie de las nanofibras, permite el incremento de la adhesión de células, proteínas y drogas. Además, se puede formar todo tipo de nanofibras con las propiedades requeridas:

biocompatibles, biodegradables, y electroactivas.

Las aplicaciones más comunes de las nanofibras se encuentran en la biomedicina.

- En la ingeniería de tejidos: para remplazar tejidos dañados incluyendo la piel, huesos, cartílago, ganglios linfáticos, vasos sanguíneos, músculos, y otros tejidos.
- En la liberación de drogas: los nanomateriales biodegradables o no-biodegradables pueden ser utilizados para controlar la liberación de drogas ya sea a través de solo la difusión o a través de la difusión y degradación.
- En los scaffolds: gran superficie y varias propiedades químicas de superficie que facilitan la adhesión celular, el crecimiento, la migración y la diferenciación celular; pueden lograr utilizando nanofibras biocompatibles.
- En la cicatrización de heridas: nuevos materiales de vendaje hechos de polímeros hilados contienen varios componentes activos beneficiosos para la curación de heridas, con tamaño de segmentos de fibras que van desde decenas de nanómetros a varios micrómetros. [7]

3.4. Electrohilado (*Electrospinning*)

El electrohilado o *electrospinning* se origina de la contracción de las palabras inglesas “*electrostatic spinning*” que significa hilado electrostático. Es un proceso que puede producir micro y/o nanofibras de polímero utilizando un chorro (*jet*) de una disolución de polímero (o una mezcla de polímeros) impulsado electrostáticamente desde una boquilla (*tip*) de diámetro milimétrico. Este método utiliza un campo eléctrico de alta tensión (voltaje) y baja intensidad para formar fibras sólidas recogidas en un colector estático o rotatorio. Las fibras sólidas se producen por la evaporación del disolvente durante su trayectoria a través del campo electrostático.[8]

Actualmente, de los diversos métodos de proceso (electrospray, electroprinting, electroblowing, etc.), el electrospinning es el único método aplicado para la producción masiva de micro/nanofibras. En efecto, el electrospinning tiene varias ventajas, en particular, la gran relación superficie-volumen, alta porosidad y propiedades fisicoquímicas mejoradas.



3.4.1. Principios de la técnica

El aparato o sistema de electrospinning está constituido básicamente de tres partes: una punta o boquilla metálica (p.e., una aguja de punta roma), una fuente de alimentación de alta tensión y baja intensidad, y un colector estático o rotatorio. La punta o boquilla es conectada a una jeringa en la que se aloja la disolución de polímero de la cual queremos obtener las electrofibras. Con el uso de una bomba de infusión o peristáltica, la disolución de polímero se dispensa a través de la punta metálica a un flujo constante y controlable. Cuando un alto voltaje es aplicado (por lo general en un rango de 10 hasta 30 kV) en el campo electrostático formado entre la punta y el colector, la gota colgante de la disolución de polímero en la boquilla de la punta se vuelve altamente electrificada y las cargas inducidas se distribuyen de manera uniforme sobre su superficie. Bajo la acción de estas interacciones electrostáticas, la gota de la disolución se perturba en un objeto cónico conocido comúnmente como el cono de Taylor. Una vez que la fuerza de los campos eléctricos superan un valor umbral, las fuerzas electrostáticas pueden superar la tensión superficial de la disolución de polímero y por lo tanto forzar la expulsión de un chorro de líquido (*jet*) desde la boquilla. Este chorro electrificado a continuación se somete a un proceso de estiramiento y batido, lo que lleva a la formación de un hilo largo y delgado. Así, el chorro de líquido es continuamente alargado y el disolvente se evapora durante su tránsito desde la punta al colector. El diámetro de las electrofibras se puede reducir en gran medida desde cientos de micrómetros hasta decenas de nanómetros. Las fibras que se forman en la punta son atraídas por el colector conectado a tierra y colocado bajo la punta o boquilla, las fibras cargadas a menudo se depositan en formas circulares y orientadas al azar formando un paño a manera de tejido. [9]

Existen diferentes tipos de hilado electrostático: se puede realizar con solo un colector estático (Fig. 3.7), o con un colector rotatorio (Fig. 3.8). La distribución de los aparatos puede ser horizontal o vertical, y esta disposición puede afectar las condiciones del electrohilado.

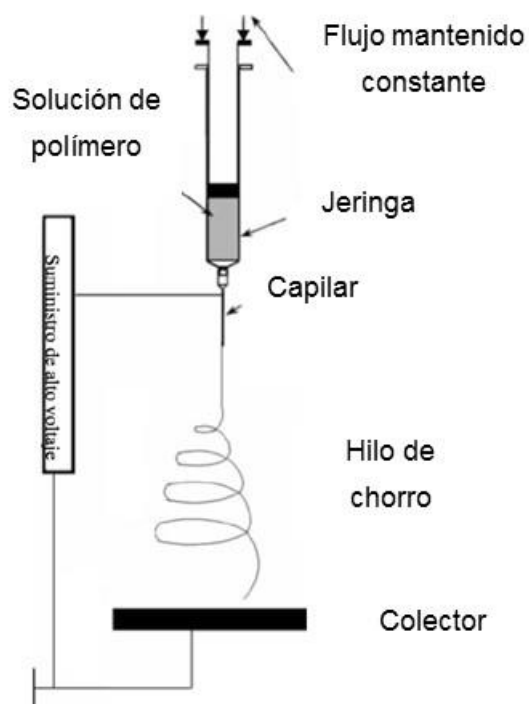


Fig. 3.7. Esquema general de la disposición de los equipos en el proceso de electrohilado vertical [10]

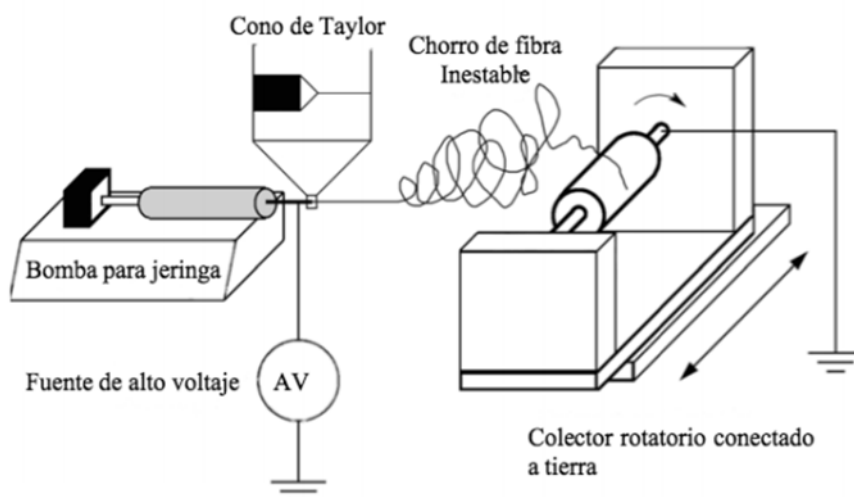


Fig. 3.8. Esquema general de la disposición de los equipos de electrohilado utilizando un colector rotatorio [10]



3.4.2. Parámetros del proceso

El electrospinning es una técnica muy sencilla que depende de varios parámetros que influyen simultáneamente sobre las propiedades y las formas de las fibras obtenidas. Estos parámetros se pueden clasificar en tres grupos.

1. Propiedades de la disolución polimérica

- a. Concentración de la disolución: es uno de los parámetros determinantes del tamaño y de la morfología de las fibras. La concentración de polímero en la disolución influye tanto en la viscosidad como en la tensión superficial de esta. A medida que se incrementa la concentración del polímero, el diámetro de las fibras también se incrementa. Con bajas viscosidades, se obtienen fibras discontinuas y con altas viscosidades, se dificulta la movilidad de la disolución en el equipo. Por lo tanto, se requiere una viscosidad óptima para cada proceso de electrospinning. [15]
- b. Peso molecular: el incremento del peso molecular disminuye el número de gotas y aglomeraciones. Por esta razón, se suele electrohilar polímeros de alto peso molecular.[12]
- c. Tensión superficial: al disminuir esta propiedad, se disminuye generalmente la presencia de agregados. Si es elevada, se produce inestabilidad en la generación del haz o chorro y se producen gotas. [13]
- d. Conductividad de la disolución: disoluciones con alta conductividad tendrán mayor capacidad de transportar las cargas de la disolución mientras que aquellas con baja conductividad tienen menor capacidad de transporte de carga. Se ha determinado que con el aumento de la conductividad eléctrica de la disolución hay una disminución significativa en el diámetro de las fibras, mientras que cuando la conductividad es baja se observa un alargamiento insuficiente del chorro lo que impide la producción de fibras uniformes. [12]

2. Variables del equipo

- a. Voltaje: es uno de los parámetros más importantes dentro del proceso de electrospinning. Algunos autores afirman que aplicar voltajes altos hace que más fluido se transporte en el chorro lo que resulta en fibras con mayores diámetros.[14] Otros afirman que un incremento en la aplicación del voltaje decrece el diámetro de las nanofibras y aumenta la probabilidad de obtener fibras con defectos. [15] Lo cierto es que en la mayoría de los casos, un voltaje alto permite un mayor estiramiento de la solución debido a la presencia de mayor fuerza de coulomb en el chorro y un fuerte campo eléctrico, todos estos

factores promueven una reducción en el diámetro de las fibras.

- b. Flujo de salida: un elevado flujo, no permite la evaporación del solvente. Por otro lado, un flujo de salida menor podría ser benéfico para evitar la formación de defectos en las fibras. Normalmente, se opera con flujos entre 0,5 o 10 mL/h. [12]
- c. Distancia entre la punta de la aguja y el plato colector: se requiere una mínima distancia para que se formen fibras. A distancia muy corta o demasiado larga, se producen aglomeraciones y gotas. La distancia está comprendida entre 5 y 30 cm. [12] Al trabajar con distancia muy grandes, las fibras electrohiladas podrían romperse debido a su propio peso. Una mínima distancia es requerida para que las fibras tengan tiempo suficiente para permitir la evaporación del disolvente antes que las fibras alcancen el plato colector.

3. Parámetros ambientales

- a. Temperatura de la disolución: el aumento de la temperatura causa una disminución en la viscosidad de la disolución, resultando fibras de diámetro más pequeño.[12]
- b. Humedad relativa del aire: la reacción temprana de las disoluciones y el retraso de la evaporación de los solventes puede producir goteo y aglomeraciones en las fibras. Así, un porcentaje óptimo de humedad relativa podría encontrarse en el rango de 10 y 40 %. [12] Además, la humedad relativa en el ambiente podría determinar la velocidad de evaporación del disolvente, con una humedad relativa baja, un disolvente volátil podría evaporarse muy rápido.

3.4.3. Historia del electrospinning

Aunque el proceso del electrospinning se conoce desde hace casi 70 años; sin embargo, las nanofibras poliméricas producidas por electrospinning se han convertido en un tema de gran interés en los últimos años. [8]

La historia del electrospinning comienza en 1600 cuando William Gilbert observó el primer registro de la atracción electrostática de un líquido. Después, en 1846, Christian Schönbein produjo celulosa altamente nitrada. En 1887, Charles VernonBoys describió el proceso sobre la fabricación de nanofibras y en 1900, John Francis Cooley presento la primera patente



del electrospinning. En 1914, John Zeleny publico trabajos sobre el comportamiento de gotas de fluido en el extremo de capilares de metal e inicio el modelamiento matemático del comportamiento de los fluidos bajo fuerzas electrostáticas. Entre 1964 y 1969, Sir Geoffrey Ingram Taylor produjo la base teórica del electrospinning, modelando matemáticamente la forma del cono formado por la gota de líquido bajo el efecto de un campo eléctrico. A principios de la década de 1990, varios grupos de investigación demostraron la obtención de nanofibras utilizando el electrospinning. Desde 1995, el número de publicaciones sobre el electrospinning fue aumentando exponencialmente cada año. [11]

A lo largo de los últimos años, se ha hecho un progreso significativo en esta área y esta tecnología fue explotada para diversas aplicaciones. La mayoría de los recientes trabajos sobre electrospinning se han centrado en comprender los aspectos fundamentales del proceso con el fin de controlar la morfología de las nanofibras, la estructura, la funcionalidad superficial y las estrategias para su distribución durante su colección, y finalmente, en la determinación de las condiciones apropiadas para realizar el electrospinning de varios polímeros y biopolímeros. [8]

3.5. Bacteriófagos

Los bacteriófagos fueron descubiertos durante la primera guerra mundial por Félix Hérelle, un biólogo franco-canadiense. Observó puntos de luz(o manchas claras) en la superficie de cultivos de bacterias en el agar. Dos años después llego a la conclusión de que era un microbio invisible al cual llamó "bacteriófagos". [21] En 1919, una importante epidemia de cólera causo estragos en la población de gallinas en Francia, y Hérelle tuvo la oportunidad de estudiar el comportamiento de este fago, inyectándolo a las gallinas. Este experimento fue un éxito, todas aquellas gallinas que habían sido infectadas por el fago curaron y la epidemia fue controlada. Más tarde, los fagos fueron probados en humanos afectados de disentería, y también curaron rápidamente.

Así, la terapia de fagos fue un tratamiento específico y eficaz contra muchas infecciones bacterianas en todo el mundo. Pero en 1945, surgieron los antibióticos, con la ventaja de ser administrados de manera más fácil que los fagos. En consecuencia, la terapia de fagos fue abandonada en el mundo occidental, pero ella se siguió utilizando ampliamente en los países del Este. [20]

3.5.1. Fundamentos teóricos

Los bacteriófagos (literalmente: *comedores de bacterias*, también llamados simplemente fagos), son virus que identifican, parasitan y matan específicamente bacterias; en cambio, son incapaces de infectar células vegetales o animales. Los fagos son entidades biológicas que proliferan en todos los lugares donde residen bacterias. Estos virus son muy resistentes pueden permanecer inertes durante meses (incluso años), en suspensión en el agua o el suelo, y en todos los medios ambientes, incluidos los ambientes extremos tales como los hielos polares, los desiertos más áridos, fuentes de aguas termales, y profundidades marinas.[20]

Los bacteriófagos están constituidos por una cubierta proteica, conocida como cápside, que envuelve su material genético. Tienen también puntos de anclaje o espículas para adherirse a las bacterias e inyectarles su material genético (Fig. 3.9).

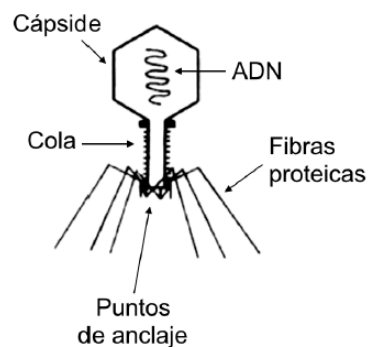


Fig. 3.9. Esquema estructural de un bacteriófago

Existen dos sistemas de replicación de los bacteriófagos: el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. Cualquier de estos ciclos de replicación empieza con un reconocimiento entre la bacteria y el bacteriófago a través de sus receptores. El ciclo lítico implica la destrucción por lisis de la bacteria que hospeda al bacteriófago. Al contrario, el ciclo lisogénico no implica una lisis celular inmediata: el bacteriófago permanece en un estado de latencia en el interior de la célula bacteriana hasta que las condiciones en su entorno no son propicias, como por ejemplo falta de nutrientes. En este momento, los fagos se activan y producen la muerte de la bacteria por lisis celular.



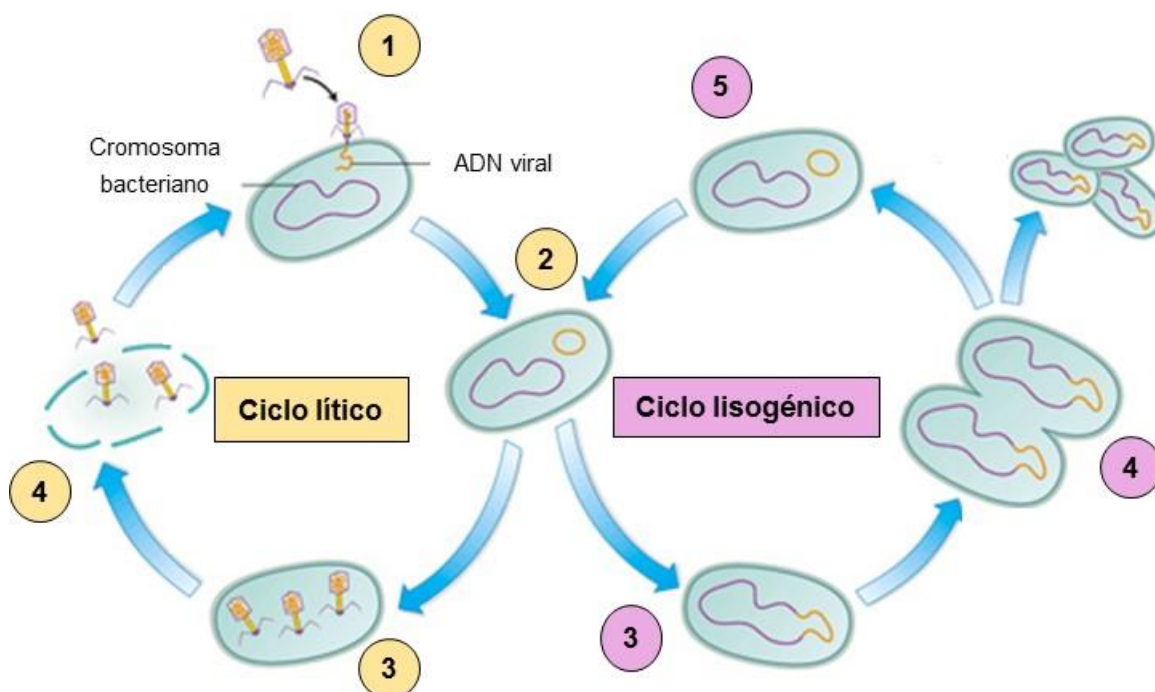


Fig. 3.10. Ciclos de replicación lítico y lisogénico de los bacteriófagos. El reconocimiento específico fago-bacteria (1) y la inyección del DNA viral en el interior de la bacteria (2) es común para ambos ciclos. En el ciclo lítico, las partículas virales se replican (3) y son liberadas por lisis bacteriana (4). En el ciclo lisogénico, el DNA viral se integra al cromosoma bacteriano (3) permaneciendo de manera latente en la población bacteriana, hasta que las condiciones ambientales le sean adversas, momento en el cual, gatilla el ciclo lítico (5).

Como se puede observar en la Fig. 3.10, el ciclo lítico empieza con la adsorción del bacteriófago en la pared de la bacteria y la inyección del ADN viral a la bacteria hospedera. Después, el material genético viral se incorpora en la bacteria bajo la forma de un elemento genético extracromosómico y toma el control del metabolismo de la bacteria hospedera para reproducirse y generar nuevas cápsides. Luego, las distintas partes que conforman un bacteriófago se ensamblan en el interior de la bacteria. Finalmente, los bacteriófagos formados se liberan de la bacteria por lisis bacteriana, causándole la muerte. Los bacteriófagos que realizan este tipo de replicación son los bacteriófagos virulentos.

En cuanto al ciclo lisogénico (Fig. 3.10), las dos primeras etapas son muy parecidas a las del ciclo lítico. Es en la tercera etapa donde las diferencias se hacen evidentes. De hecho, ciertos fagos tienen la capacidad de integrarse al genoma bacteriano y de esta forma pueden conceder eventualmente a su hospedero nuevas propiedades transmisibles por el aporte de

material genético de origen viral [20]. Es lo que pasa en el ciclo lisogénico, el ADN viral se integra dentro del cromosoma bacteriano de modo que se mantiene en forma latente integrada. Las bacterias se replican del modo habitual durante diversas generaciones hasta que espontáneamente o como consecuencia de algún agente inductor externo, el material genético del bacteriófago se escinde o separa del cromosoma bacteriano dando lugar a fragmentos aislados de ADN del bacteriófago. Así, el ciclo lítico se inicia para finalizar con la formación de nuevos bacteriófagos. El ciclo lisogénico se produce con fagos temperados (fagos atenuados por incremento de la temperatura).

3.5.2. Bacteriófagos versus antibióticos

La terapia de fagos se inició hace más de 80 años. Después de un éxito prometedor, fue abandonada en favor de los antibióticos. Las razones de su abandono fueron múltiples: la ignorancia inicial de su naturaleza, los numerosos fallos que lo han desacreditado, el advenimiento de los antibióticos que permitieron tratar rápidamente las infecciones. Sin embargo, cada uno de ellos, bacteriófagos y antibióticos tienen sus ventajas e inconvenientes.

En primer lugar, una de las ventajas más importante de los bacteriófagos reside en el hecho que se reproducen solamente en las bacterias infecciosas, es decir solo compromete a la infección, y así las células del organismo (humano o animal) no son afectadas por los fagos. Esta particularidad de los fagos, les confiere ventaja sobre los antibióticos, los cuales son responsables del desequilibrio de la flora bacteriana, y en consecuencia producen trastornos digestivos, micosis e infecciones oportunistas secundarias como efectos adversos durante el tratamiento con antibióticos. [20]

Los antibióticos y bacteriófagos también se diferencian entre sí en su radio de acción. Los antibióticos no se concentran solamente en el lugar dónde se concentra la infección, sino que se distribuyen de manera general, se metabolizan y finalmente se eliminan del cuerpo. Sin embargo, los bacteriófagos necesitan de las bacterias para poder replicarse, y solo se reproducen en la medida que se encuentren bacterias. Los fagos son eliminados rápidamente después de la curación de la infección. Asimismo, en comparación con los antibióticos, los bacteriófagos pueden ser considerados como una droga “inteligente” y además sin efectos secundarios importantes.

Por otro lado, los antibióticos no siempre son efectivos en el tratamiento de las infecciones, con ellos se llega a un punto en que las bacterias se hacen resistentes a los mismos (resistencia antimicrobiana). Sin embargo, los bacteriófagos pueden erradicar las infecciones



bacterianas; y en el caso de que se desarrollen bacterias resistentes a los mismos, pueden desarrollarse bacteriófagos que las afecten, este mecanismo puede ser entendido en el contexto de la co-evolución.

Finalmente, el tratamiento de las infecciones bacterianas con bacteriófagos (vieja terapia en el mundo occidental) en la actualidad parece capaz de contribuir en la investigación de nuevas formas para luchar contra las infecciones bacterianas, en especial ahora que el fracaso del tratamiento antibacteriano usando antibióticos es cada vez más frecuente. De hecho, según su descubridor Félix Hérelle, “la terapia antibacteriana usando fagos no es más que el tratamiento contra la bacteriana patógena mediante la administración de su depredador natural”.^[20]

3.5.3. Bacteriófagos: biofármacos

La palabra biofármaco se aplica a cualquier agente terapéutico obtenido mediante métodos biotecnológicos. Generalmente se trata de sustancias químicamente complejas, habitualmente de estructura proteica o glucoproteica, lo que dificulta en extremo o impide su síntesis mediante procesos químicos convencionales. De ahí, la gran importancia de la biotecnología o tecnología de ADN recombinante, la cual puede ser definida como el proceso mediante el cual se consigue la clonación del gen que codifica una determinada proteína en un vector y su transformación en una bacteria o en una célula de mamífero.

Las principales diferencias de los biofármacos con relación a los producidos mediante síntesis química consisten en el mayor tamaño molecular y en la complejidad de su estructura molecular.

3.5.3.1. Clorhexidina digluconato

La clorhexidina digluconato (CHX) es utilizada como un antiséptico tópico y un desinfectante que es efectivo contra una amplia diversidad de bacterias, virus y hongos. Así, un antiséptico es un agente anti-infeccioso que puede ser usado de forma local en los humanos y animales. Los antisépticos se diferencian de los desinfectantes, los cuales pueden destruir tanto a las esporas como a las formas vegetativas de los microorganismos.

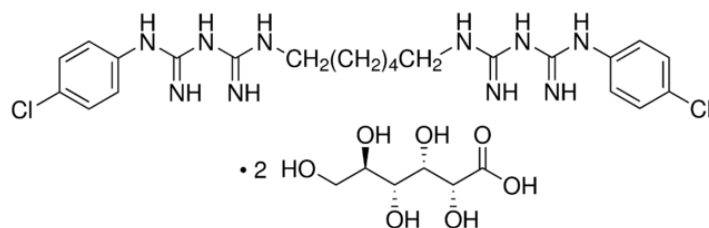


Fig. 3.11. Estructura química de la clorhexidina digluconato (CHX)

La CHX ha sido utilizada como un agente antibacteriano en los productos oftálmicos comerciales para remplazar al timerosal (un conservante utilizado en la preparación de vacunas y que fue puesto en desuso debido a su contenido de mercurio). Sin embargo, debido a efectos secundarios como los problemas de sensibilidad de la piel, fue reemplazado en las preparaciones oftálmicas por el metil p-hidroxibenzoato (“metilparabeno”). La CHX también tiene aplicación como desinfectante bucal y dental (p.e., Oraldine®), pero se ha demostrado que puede causar la decoloración de los dientes y las encías.

3.5.3.2. Poli(hexametilenbiguanida)

La poli(hexametilenbiguanida) o PHMB es un polímero antibacteriano que deriva de la biguanida (p.e. CHX es una biguanida). Su actividad antibacteriana es similar a la CHX, pero su naturaleza polimérica hace que las concentraciones requeridas en sus aplicaciones sean menores.

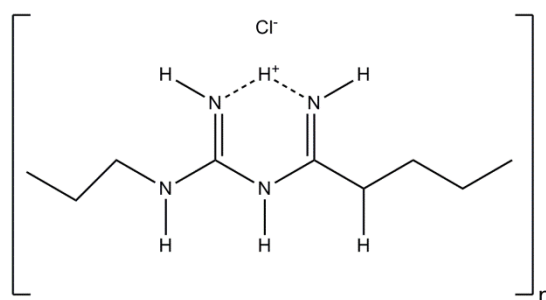


Fig. 3.12. Estructura química de la poli(hexametilenbiguanida) (PHMB).

El PHMB es utilizado como conservante y como agente antimicrobiano. Como conservante, el PHMB se utiliza en cosméticos, productos de cuidado personal, suavizantes, soluciones



para lentes de contacto, desinfectante de manos, etc. En la cosmética, el PHMB se utiliza como un conservante de amplio espectro debido a su excelente actividad contra una amplia diversidad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos y levaduras. El PHMB es particularmente eficaz contra las bacterias del género *Pseudomonas*, que son difíciles de controlar. Es soluble en agua, y por lo tanto, ampliamente utilizado en productos en base acuosa, los cuales son más susceptibles al crecimiento de microorganismos.

Otros usos indicados para el PHMB, son la purificación de agua de piscina, higienización de vasos de bebidas, la desinfección de superficies sólidas en la restauración y conservación a corto plazo de cueros y pieles.

3.6. Antecedentes bibliográficos

La técnica del electrospinning es un método eficaz para elaborar micro y nanofibras para aplicaciones muy específicas empleadas en los campos de la ingeniería de tejidos o de la liberación controlada de fármacos. Esta técnica permite la utilización de distintos polímeros tanto sintéticos como naturales.

A partir de estas electrofibras, se puede obtener hidrogeles mediante una reacción de reticulación de las fibras. Estos hidrogeles tienen propiedades muy específicas tales como su alta retención de agua que se evidencia por el hinchamiento del hidrogel. Así, con estas propiedades, los bacteriófagos pueden ser incorporados en estos hidrogeles, con la finalidad que estos nuevos materiales liberen bacteriófagos para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Para exponer el estado del arte de estas técnicas y métodos, se resumen en este apartado tres artículos que pueden dar al lector una visión general de los trabajos en los que se han desarrollado nanofibras de PGGA reticuladas. Las características de estas fibras ofrecen la posibilidad de ser cargadas o impregnadas con bacteriófagos con la finalidad de conformar un nuevo material antibacteriano.

1. M. Matsusaki et al. [16], prepararon en 2007 tejidos diseñados en tres dimensiones (3D) compuestos de células y matriz extracelular mediante la estrategia de plantillas de hidrogeles. Primero, prepararon plantillas de hidrogeles mediante una reacción de reticulación del polímero PGGA. Después, utilizaron agentes reductores para descomponer los hidrogeles, para que sean solubles en el medio de cultivo celular. Luego, diseñaron los tejidos en 3D, compuestos de células de ratón de tipo

fibroblastos y matrices extracelulares, poniendo el hidrogel descompuesto en el medio de cultivo celular durante 10 días. Esta estrategia de plantilla de hidrogel puede ser útil como una nueva clase de tecnología de la ingeniería de los tejidos blandos para substituir un andamio de polímero sintético por el andamio de matriz extracelular producida a partir de células cultivadas.

2. H. Yoshida et al. **[17]**, desarrollaron en 2009 andamios innovadores de fibras de PGGA, insolubles en agua, y las ensayaron en cultivo celular. Produjeron fibras de PGGA de 0.005-0.5 mm de diámetro, utilizando la técnica del electrospinning. Después, mediante una reacción de reticulación de las fibras con cistamina en presencia de EDC, produjeron matrices de PGGA entrecruzadas con enlaces disulfuro, siendo estas matrices insolubles en agua. Luego, estas fibras reticuladas fueron descompuestas en condiciones fisiológicas usando un reductor biocompatible, la L-cisteína. Los experimentos in-vitro con células de tipo fibroblastos de ratón mostraron buena adhesión sobre las matrices de fibra de PGGA, y la proliferación celular fue excelente.
3. S. Wang et al. **[18]**, realizaron en 2011 la fabricación de nanofibras electrohiladas de PGGA estables en agua, con aplicaciones biomédicas. Optimizaron los parámetros del proceso del electrospinning para obtener nanofibras con una morfología suave. Los parámetros optimizados fueron: concentración polimérica 16%-wt, solvente de TFA en solución acuosa al 1-10%-wt, flujo de salida 0.3 mL/h, voltaje 30 kV, distancia del colector 40 cm y humedad ambiente menos de 50%. Obtuvieron fibras con un diámetro de 255 nm. Luego, las trataron con el agente de reticulación, la cistamina durante 72h para que las fibras tengan una buena estabilidad en el agua. Las nanofibras de PGGA obtenidas tuvieron una excelente biocompatibilidad para promover la adhesión y proliferación celular.



4. Materiales y métodos

4.1. Material

4.1.1. Reactivos químicos

Los reactivos utilizados en el presente proyecto para los distintos experimentos fueron:

- El ácido poli (γ -glutámico) (PGGA) de bajo peso molecular (200,000 – 500,000) proporcionado por Wako.
- El 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), Sigma Aldrich.
- La 2,2'-Diaminodiethyl disulfide dihydrochloride (cistamina), Sigma Aldrich.
- Bacteriófagos Fersisi, Eliava BioPreparations
- Clorhexidina digluconato (CHX) disolución 20% agua, Sigma Aldrich.
- Poli(hexametilenbiguanida) (PHMB)

4.1.2. Disolventes

Los diferentes disolventes utilizados para la realización de los diferentes ensayos realizados fueron:

- | | |
|---|-----------------------------|
| • Ácido trifluoro acético (TFA), Scharlau | • Agua milliQ®, Millipore |
| • Agua destilada | • Etanol absoluto, Scharlau |
| | • Metanol, Panreac |

4.1.3. Material de laboratorio

Para realizar los diferentes ensayos de laboratorio, se han utilizado los siguientes materiales:

- | | |
|---|---|
| • Agitador magnético | • Balanza analítica |
| • Aguja 18Gde 1,2 mm de diámetro externo, y 0.84 mm de diámetro interno | • Bolsas de diálisis(ancho plano: 54 mm, diámetro: 34 mm) |
| | • Espátula y pinzas de precisión |

- Jeringa de 10 mL
- Micro pipetas de 1 y 5 mL
- Papel aluminio
- Pipetas Pasteur y peras de aspiración
- Placas de Petri
- Porta y cubreobjetos para microscopía óptica
- Probetas de 10 y 20 mL
- Tijeras
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Viales de 10, 20 y 50 mL

En cuanto a los equipos de protección personal, se han empleado:

- Bata de laboratorio
- Guantes de nitrilo

4.1.4. Equipos de laboratorio

Para realizar los diferentes ensayos en este proyecto, se han utilizado los siguientes equipos de laboratorio:

- Banco de Kofler
- Centrifuga, ThermoFischer scientific.
- Liofilizador
- Equipo del electrospinning: fuente de alimentación de alto voltaje, una bomba de infusión de jeringa, aparato bifásico de electrospinning y una superficie colectora.
- Estufa 37°C y 70°C
- Microscopio óptico (OM) *ZeissAxioskop 40*
- Equipo ELISA lector de micro placas, *EZ-READ 400 ELISA*
- Equipo de ángulos de contacto, *DataPhysics OCA 15plus*
- Espectrofotómetro SHIMADZU UV-3600
- Estufa microbiológica con agitación orbital.

Para el caso de las imágenes de microscopia de barrido electrónico (SEM), fueron obtenidas mediante un microscopio de haz de iones focalizados (*Focused Ion BeamZeissNeon 40*) con doble columna electrónica, acoplado a una columna GEMINI SEM con filamento de emisión de campo Shottky: 4 pA - 20 nA, 0.1 - 30 kV, resolución 1.1 nm a 20 µm.

Todos los análisis térmicos se llevaron a cabo con un DSC Q100 (*TA Instruments*) equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado. La degradación de algunas muestras se estudió



en una velocidad de calentamiento de 20°C/min con alrededor de 5 mg en un analizador termogravimétrico Q50 (*TA Instruments*) en una gama de temperaturas de 30°C a 600°C.

Los gráficos de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) fueron obtenidos mediante el Espectrómetro fotoelectrónico de Rayos X, *SPECS system* equipado con un detector *Phoibos 150 MCD-9* y una cámara de reacción HPC-20.

4.2. Generación de nanofibras del PGGA

4.2.1. Preparación de la disolución polimérica de PGGA

Para obtener nanofibras con la técnica del electrospinning, es necesario previamente transformar el polímero PGGA del estado sólido, al estado de disolución polimérica. Por eso, se ha utilizado el siguiente procedimiento:

1. Buscar diferentes solventes en los cuales el polímero PGGA podrá ser soluble.
2. Calcular la masa de polímero PGGA y el volumen de solvente para realizar la disolución polimérica.
3. Pesar la masa de PGGA ya calculada e introducirla en un vial.
4. Con ayuda de una micro pipeta, medir el volumen requerido de solvente e introducirlo en el vial con el polímero.
5. Cerrar el vial y dejarlo agitando durante un cierto tiempo de disolución.
6. Centrifugar la disolución de polímero a 10000 rpm durante 10 min. Debido a que el PGGA utilizado tiene un rango de peso molecular de 200,000 hasta 500,000 g/mol y es difícil disolverlo de manera homogénea. Solo hay una cierta fracción de PGGA que se disuelve y entonces es esta que utilizamos para hacer el electrospinning y obtener nanofibras.

Los diferentes solventes utilizados para realizar estos ensayos de disolución polimérica fueron:

- Acetonitrilo (C_2H_3N)
- Ácido dicloroacético ($C_2H_2Cl_2O_2$)
- Ácido acético en solución acuosa (CH_3COOH)
- Ácido trifluoro acético (TFA) ($C_2HF_3O_2$) en solución acuosa a 5%-wt

- Ácido trifluoro acético puro (TFA) ($C_2HF_3O_2$)
- Agua destilada
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) a 0.5M
- Cloroformo ($CHCl_3$)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6OS)
- Hexafluoro Isopropanol (HFIP) ($C_3H_2F_6O$)
- Mezcla Cloroformo ($CHCl_3$) y Acetona (C_3H_6O), (2:1 v/v)
- Mezcla dimetilformamida (DMF) (C_3H_7NO) y diclorometano (DCM) (CH_2Cl_2), (3:7 v/v)

4.2.2. Electrospinning

El equipo de electrospinning que se ha utilizado para la realización de nanofibras de PGGA es el que está representado en la Fig. 4.1.

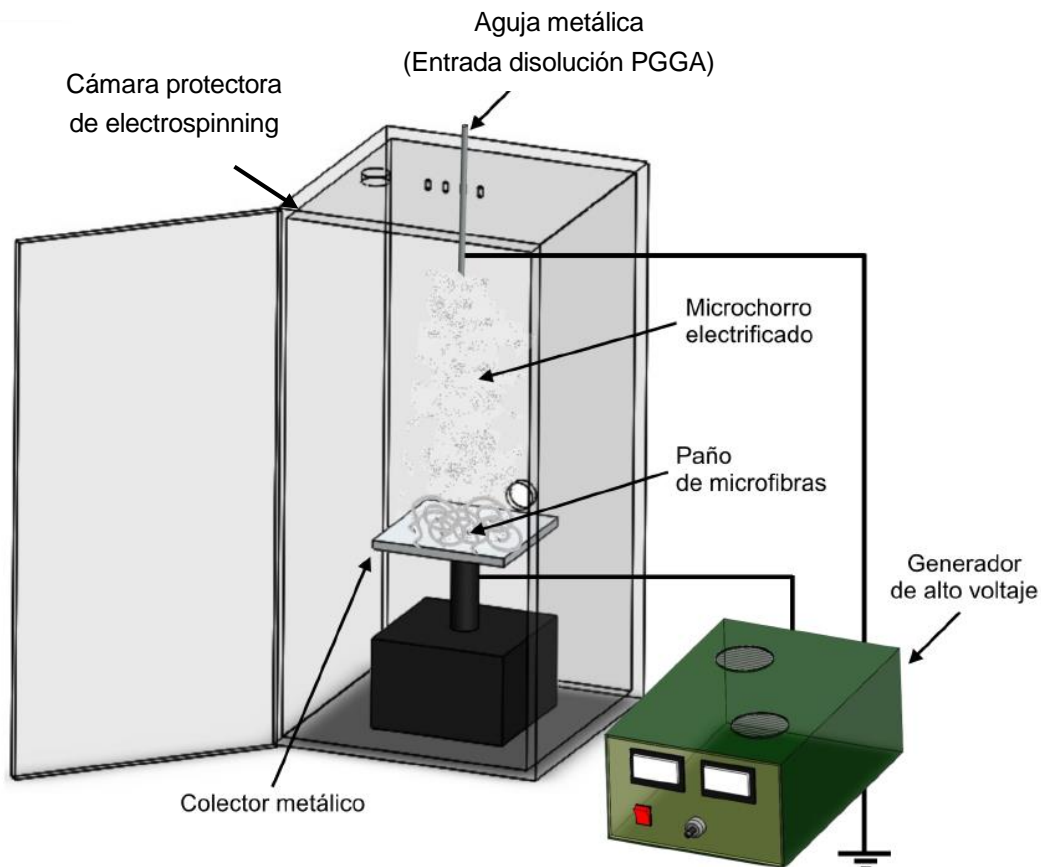


Fig. 4.1. Esquema del equipo de electrospinning utilizado (unidad de bombeo no incluida). [19]



El procedimiento utilizado para realizar el electrospinning de las diferentes muestras de disolución polimérica es siempre el siguiente:

1. Cargar una jeringa de 10 mL con una solución polimérica, y conectar una aguja 18G de 0.84 mm de diámetro interno. Colocar la aguja en el hueco situado en la parte superior de la cámara protectora de electrospinning (Fig. 4.1.) y conectarla al generador de alto voltaje. Conectar la jeringa a una unidad de bombeo la cual permite producir un flujo de salida constante. Elegir la distancia aguja-colector. Cubrir la superficie colectora con papel de aluminio y poner un cubreobjetos encima para poder analizar muestras en el OM.
2. Encender la bomba y definir el tipo de jeringa, volumen de solución y flujo al cual se realizará el experimento.
3. Al ver caer la primera gota de solución polimérica, encender la fuente de alimentación y regular el voltaje al que se quiere trabajar.
4. Observar que se forma el cono de Taylor en la punta de la aguja, y recoger muestras en el cubreobjetos.
5. Analizar el cubreobjetos en el OM y si las fibras son correctas, recoger todo el volumen de solución sobre el papel de aluminio para obtener una matriz (*scaffolds*).

4.2.2.1. Pruebas de electrospinning de las diferentes disoluciones poliméricas

Después de tener diferentes ensayos de la disolución de PGGA con diferentes solventes, se intenta electrohilarlos para ver si el PGGA se disuelve bien en cada solvente. El procedimiento es el mismo que esta descrito anteriormente. Aquí se elige un flujo de salida bajo cualquier (entre 0.1 y 0.5 mL/h) porque se hace una prueba solo cualitativa, y no es importante conocer el flujo de manera exacta.

4.2.2.2. Determinación de los parámetros óptimos del proceso

Después de seleccionar el disolvente más adecuado para disolver el PGGA, tenemos que determinar los parámetros operacionales óptimos del proceso para obtener electrofibras sin defectos.

1. Concentración óptima de la disolución polimérica

Para determinar la concentración óptima de la disolución polimérica de PGGA, se hace un ensayo de electrospinning con 5 muestras de diferentes concentraciones en el TFA puro

(Tabla 4.1.). Se utilizó el mismo procedimiento que esta descrito anteriormente en el aparato 4.2.2 y se ha analizado al OM la morfología de las fibras obtenidas para determinar la concentración óptima.

Tabla 4.1. Ensayo de electrospinning con 5 muestras de diferentes concentraciones en TFA puro

Concentración de polímero(%-wt)	Cantidades (PGGA/TFA puro)
3	0,2g/5mL
5	0,4g/5mL
8	0,6g/5mL
11	0,8g/5mL
13	1g/5mL

2. Distancia óptima aguja-colector

Para determinar la distancia óptima aguja-colector se utilizó el mismo procedimiento que esta descrito anteriormente en el aparato 4.2.2. Se ha probado 2 distancias diferentes (15 cm y 25 cm) y se ha analizado al OM la morfología de las fibras obtenidas.

3. Tiempo de disolución óptimo

Se ha probado tres tiempos de disolución del PGGA en el TFA puro: 24h, 48h y 72h. Después, se utilizó el mismo procedimiento que esta descrito anteriormente en el párrafo 4.2.2. Pero, no se obtuvo fibras con la muestra con un tiempo de disolución (t_d) de 24h. Se analizó al OM las fibras obtenidas con las muestras con un t_d de 48h y 72h.

4. Flujo óptimo de salida

Para determinar el flujo de salida óptimo para cada una de las 3 concentraciones se utilizó el mismo procedimiento que esta descrito anteriormente en el aparato 4.2.2. Se probaron diferentes flujos de salida con las diferentes disoluciones y se analizaron las fibras obtenidas al OM.



4.3. Proceso de entrecruzamiento químico: reticulación

Un proceso de entrecruzamiento consiste en unir químicamente dos o más moléculas con un enlace covalente mediante una molécula reticulante.

Los reactivos de reticulación (o reticulantes) son moléculas que contienen dos o más extremos capaces de reaccionar o que son unidos químicamente a grupos funcionales específicos. De hecho, solo existen cuatro grupos funcionales capaces de producir una reacción de reticulación: aminas primarias (NH_2), carboxilos (COOH), sulfhidrilos (SH) y carbonilos (CHO). En este proyecto, los reactivos de reticulación son el ácido poli (α -glutámico) (PGGA) y la 2,2'-Diaminodiethyl disulfide dihydrochloride (cistamina).

En este proyecto, hemos utilizado como agente de reticulación la 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC), Fig. 4.2. De hecho, las carbodiimidias son agentes de reticulación que causan la conjugación directa de carboxilos ($-\text{COOH}$) a aminas primarias ($-\text{NH}_2$) sin llegar a ser parte de la reticulación final (enlace amida) entre las moléculas meta. El PGGA tiene el grupo funcional carboxílico y la cistamina es una amina primaria.

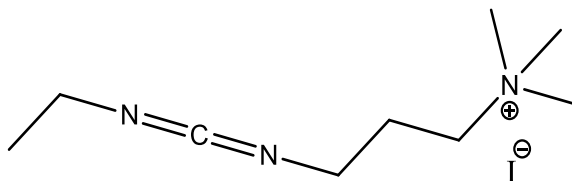


Fig. 4.2. Representación química de la 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDC)

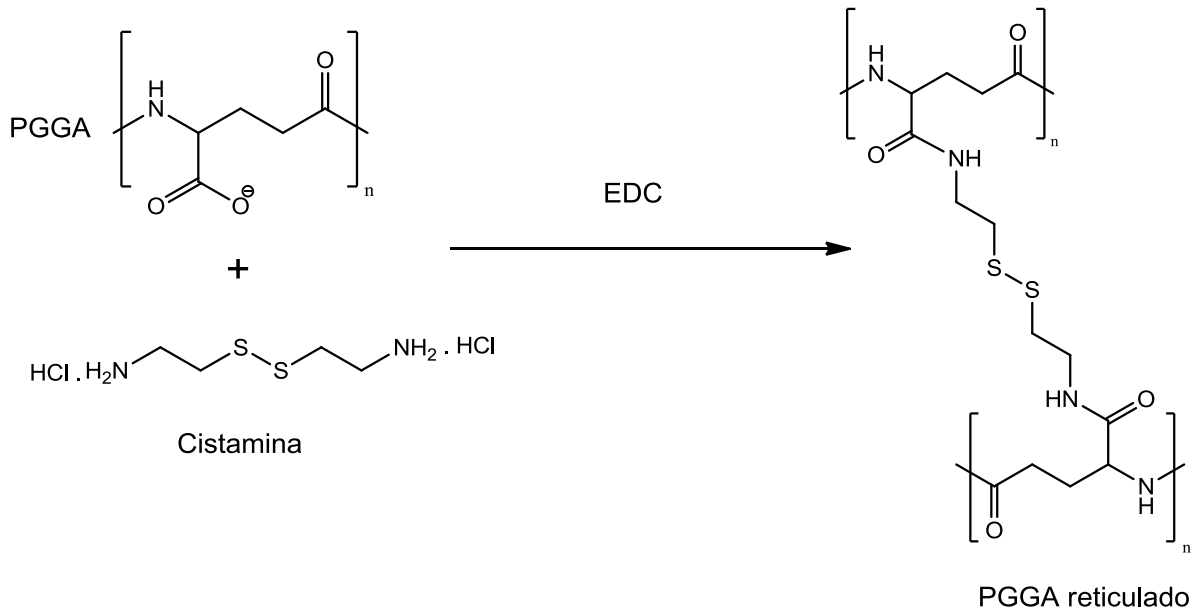
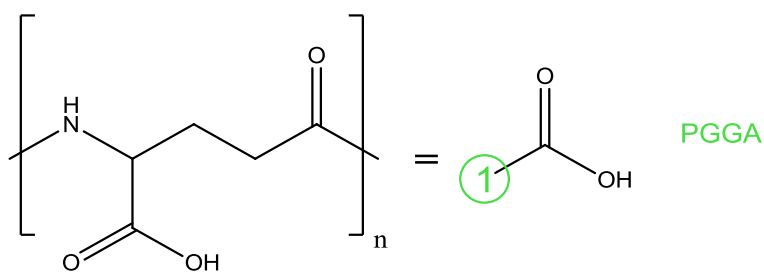


Fig. 4.3. Esquema global de la reacción de reticulación del PGGA con la cistamina, utilizando como agente de reticulación el EDC.

4.3.1. Mecanismo reacción química

Para entender mejor lo que ocurre durante esta reacción de entrecruzamiento, vamos a detallar el mecanismo de la reacción química.

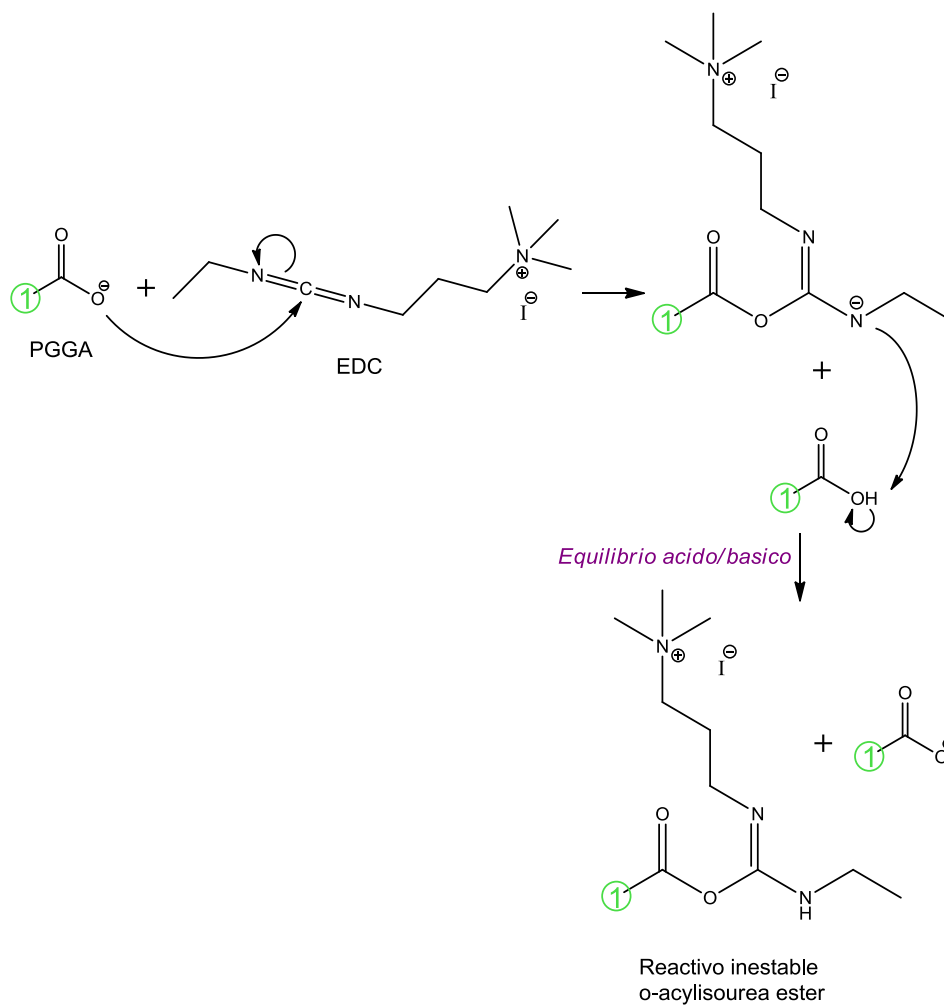
Para simplificar el mecanismo de la reacción, anotaremos el polímero PGGA de esta forma:



1. Primera etapa : activación de los grupos carboxilos (COOH) del PGGA

La primera etapa de la reacción corresponde a la activación del PGGA con la carbodiimida (EDC), para que pueda reaccionar con la cistamina después.

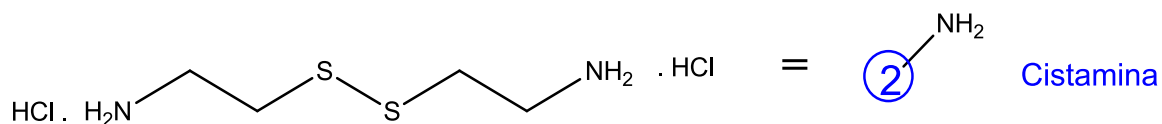




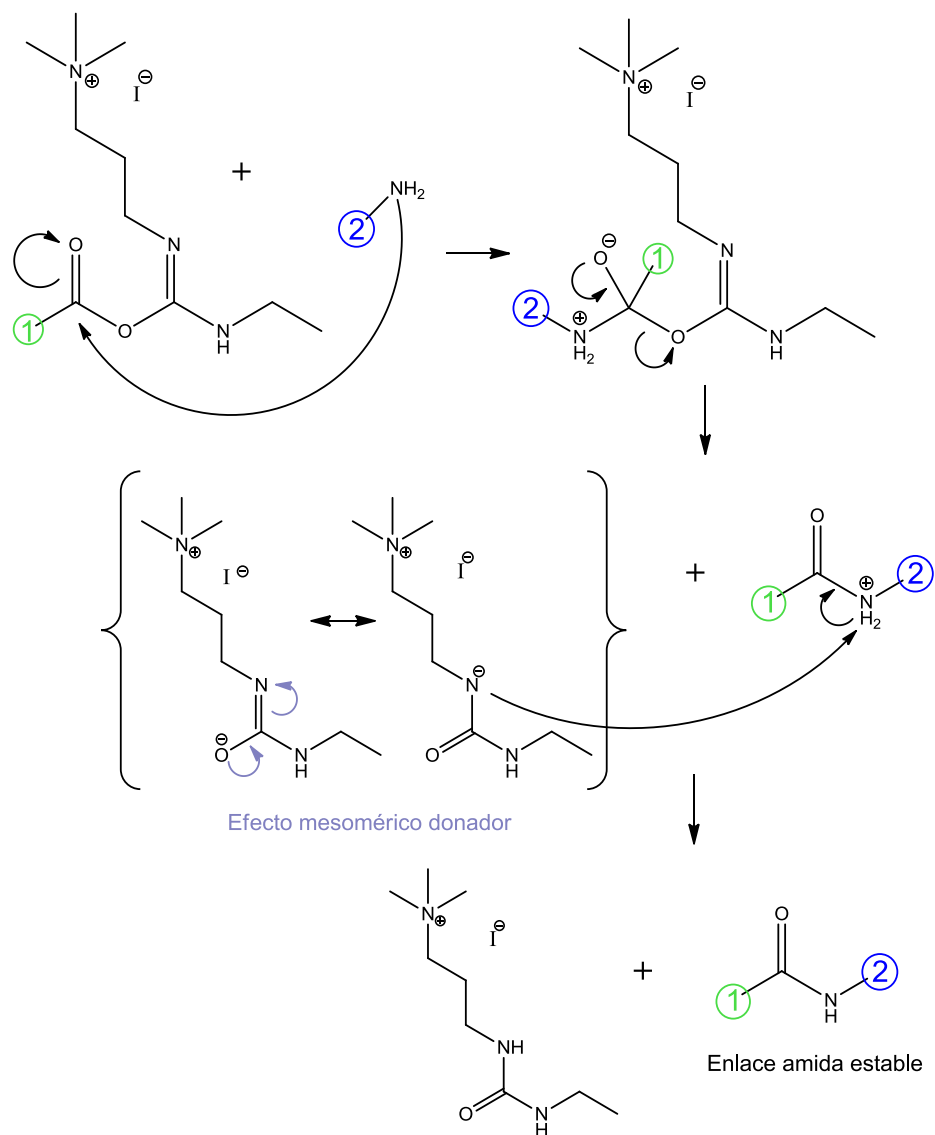
2. Segunda etapa: reacción de reticulación del PGA con la cistamina

La segunda etapa consiste en la reacción entre el PGA ya activado y la cistamina. Es una reacción amino-ácido para formar un enlace amida.

Anotaremos la cistamina esta manera en el mecanismo de la segunda etapa:



A continuación, vamos a detallar el mecanismo de esta segunda etapa.



Al final de esta reacción, obtenemos un polímero de PGGA reticulado por un enlace amida disulfuro estable. El producto final que obtenemos es el representado en la Fig. 4.3.

Esta reacción de reticulación nos permite obtener un polímero que tiene las propiedades de un hidrogel, es decir que se hincha en contacto con el agua formando materiales blandos y elásticos y que retiene una fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse. Estas propiedades son importantes para poder incorporar compuestos activos en el polímero PGGA, tales como bacteriófagos o biofármaco.



4.3.2. Procedimiento óptimo

Para llevar a cabo un procedimiento óptimo de la reacción de reticulación de las fibras de PGGA, diferentes ensayos fueron realizados. Se ha detallado estos diferentes ensayos en el párrafo 5.3 con cada resultado obtenido.

En cuanto al procedimiento óptimo, se decidió recoger 5 hojas de matrices de PGGA mediante el mismo proceso del electrospinning que esta descrito anteriormente en el párrafo 4.2.2. Además, se decidió hacer la reacción con 3 porcentajes diferentes de entrecruzamiento: 50%, 75% y 100%, para ensayar el efecto de este porcentaje sobre el aspecto de los hidrogeles obtenidos.

El procedimiento óptimo que se ha llevado a cabo para hacer la reacción de reticulación es el siguiente.

1. Preparación de las fibras

- a. Cortar cada hoja de nanofibras de PGGA en cuadrados de 1 cm².
- b. Despegar cuidadosamente cada cuadrado de fibras del papel de aluminio y ponerlas en 4 pilas para obtener 4 muestras de cada hoja: 3 muestras para probar los 3 porcentajes de entrecruzamiento y otra para tener un blanco de reacción.
- c. Sellar los bordes de cada pila de fibras utilizando un banco Kofler.
- d. Pesar cada muestra de fibras para saber el número de moles de cada muestra.

2. Calculo de las cantidades de reactivos requeridos

En el procedimiento optimo se utilizó como referencia las cantidades que utilizan Yoshida et al. [17], es decir 10 mg de EDC y 10 mg de cistamina en 1mL de Etanol.

Conociendo el peso molecular del EDC y de la cistamina (297.18 g/mol y 225.2 g/mol respectivamente), se puede deducir la concentración requerida de estos reactivos:

$$[\text{EDC}] = 0.0336\text{M y } [\text{Cistamina}] = 0.0222\text{M.}$$

Como se puede observar en el mecanismo de la reacción detallado anteriormente en el apartado 4.3.1, un mol de PGGA reacciona con un mol de EDC. Pero, un mol de PGGA reacciona con 0.5mol de cistamina porque por cada molécula de cistamina dos unidades repetitivas de PGGA reaccionan. Entonces:

$$\begin{aligned} 1 \text{ mol PGGA} &= 1 \text{ mol EDC} \\ 1 \text{ mol PGGA} &= 0.5 \text{ mol cistamina} \end{aligned}$$

Así, podemos calcular el volumen de cada solución de reactivos para cada muestra de fibras:

$$V_{EDC} = \frac{\%E \times n_{PGGA}}{[EDC]} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

$$V_{cistamina} = \frac{\%E \times 0.5n_{PGGA}}{[Cistamina]} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Donde, %E= 50%, 75% o 100% corresponde al porcentaje de entrecruzamiento; n_{PGGA} corresponde al número de moles de cada muestra de fibras de PGGA; $[EDC] = 0.0336M$ y $[Cistamina] = 0.0222M$.

Después, se calcula el volumen total de solución de EDC ($V_{tot\ EDC}$) y el volumen total de solución de cistamina ($V_{tot\ cistamina}$) que se tiene que preparar.

La EDC se disuelve en etanol. Sin embargo, la cistamina tiene que disolverse primero en metanol y después en etanol para obtener una buena disolución. La proporción metanol/etanol optima que se ha desarrollado es de 35:65. Entonces:

$$V_{tot\ EDC} = V_{EtOH\ 1}$$

$$V_{tot\ cistamina} = 0.35 \times V_{MetOH} + 0.65 \times V_{EtOH\ 2}$$

Por fin, se obtiene el peso de EDC y de cistamina requeridos para obtener las dos soluciones con una concentración específica:

$$m_{EDC} = [EDC] \times PM_{EDC} \times V_{totEDC} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$m_{cistamina} = [Cistamina] \times PM_{Cistamina} \times V_{totcistamina} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Donde, $PM_{EDC} = 297.18\text{ g/mol}$ y $PM_{cistamina} = 225.2\text{ g/mol}$.

3. Primera etapa de la reacción con la EDC

- a. Pesar la cantidad de EDC calculada para hacer la solución y disolverla en el volumen de etanol requerido. Dejar la solución en agitación magnética durante una hora.
- b. Medir mediante una micro pipeta cada volumen de solución de EDC calculado y ponerlos en viales diferentes.
- c. Poner cada muestra de fibras de PGGA en su vial correspondiente y dejarlas durante 24 horas en agitación mecánica



4. Reacción de reticulación con la cistamina

- a. Pesar la cantidad de cistamina calculada anteriormente y disolverla primero en el volumen de metanol requerido, agitando magnéticamente. Cuando todo el sólido se ha disuelto, verter el etanol en la solución y dejar agitando.
- b. Medir mediante una micro pipeta cada volumen de solución de cistamina calculado y ponerlos en viales diferentes.
- c. Sacar cada muestra de fibras de su vial con la solución de EDC y ponerlas en su vial de cistamina correspondiente. Dejar los viales en la estufa a 70°C durante 6 horas.

5. Lavado y secado

- a. Sacar cada muestra de hidrogel y ponerlos en un vial con agua MilliQ. Dejarlos en agitación mecánica durante 24 horas.
- b. Después de 24 horas, cambiar el agua para lavar bien todo la EDC de los hidrogeles, volverlos a dejar durante 24 horas en agitación mecánica.
- c. Sacar cada hidrogel del agua y pesarlos.
- d. Poner cada hidrogel en otro vial para ponerlos a congelar a -80°C durante 6 horas.
- e. Sacar las muestras del congelador y ponerlas en el liofilizador para que evapore al vacío toda el agua congelada en los hidrogeles. Dejar las muestras durante 48 horas.

4.4. Ensayos de degradación de los hidrogeles

Los ensayos de degradación se hicieron utilizando la lipasa *Rhizopusoryzaea* una concentración de 0.1 mg/mL en una solución tampón de PBS. Aproximadamente 25 mg del hidrogel se colocaron en 5 mL del medio enzimático a 37 °C.

El medio se renovó cada 48h, sacando muestras a intervalos definidos. Las muestras degradadas se congelaron, liofilizaron y pesaron.

4.5. Ensayos biológicos

4.5.1. Carga de bacteriófagos y su liberación, en bacterias, desde el hidrogel

Para el estudio de la liberación de bacteriófagos, se usó los bacteriófagos Fersisi. Estos ensayos fueron realizados con 3 muestras de hidrogeles con un 50%E de entrecruzamiento.

1. Carga de bacteriófagos

Se pesó cada muestra de hidrogel y se pusieron en 1mL de Fersisi. Se dejaron en agitación mecánica durante 24h a 37°C.

Los bacteriófagos Fersisi utilizados tenían una actividad según el fabricante de 10^{10} UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

2. Liberación de bacteriófagos en caldo de cultivo con bacterias

La liberación de los bacteriófagos desde el hidrogel se llevó a cabo en 10 mL de caldo de cultivo, que proporciona los nutrientes necesarios para permitir el crecimiento, y 100µL de bacterias *Staphylococcus Aureus*.

La medida del control, se llevó a cabo en tubos con 10 mL de caldo de cultivo y 100 µL de bacterias sin hidrogel. Todos los tubos se incubaron a una temperatura de 37°C, y se mantuvo en agitación suave para favorecer la liberación de los bacteriófagos.

El extracto para caldo de cultivo que se ha utilizado es el *brain-heart infusion*, Scharlau. Este se ha preparado reconstituyendo 37 g del extracto en 1 L de agua y se ha esterilizado posteriormente en un autoclave.

Para evaluar el crecimiento bacteriano en cada uno de los tubos, se han tomado 100 µL de cada muestra y se han realizado medidas de absorbancia a diferentes tiempos, para una longitud de onda de 595 nm. Para ello, se ha utilizado un lector de microplacas ELISA.

4.5.2. Carga de biofármacos y su liberación desde el hidrogel

Para el estudio de la liberación de biofármacos, se usó la clorhexidina (CHX) y el poli(hexametilenbiguanida) (PHMB).

Estos ensayos fueron realizados con 5 muestras de hidrogel para cada tipo de biofármaco: 3 muestras para realizar su liberación y 2 muestras para probar la liberación en un cultivo de bacterias.

Para los ensayos con la CHX, se utilizaron muestras de hidrogel con un porcentaje de entrecruzamiento de 100%E. Por otro lado, los ensayos con el PHMB se realizaron con



hidrogeles al 75%E.

1. Carga de biofármacos

Para el estudio de la liberación del fármaco (CHX y PHMB), se prepararon las diferentes disoluciones:

- Disolución de la CHX al 6,2%p/v
- Disolución de PHMB al 1,5%p/v

Después se colocaron las muestras de hidrogel a cargar con estos biofármacos en 5mL de las disoluciones preparadas de CHX y PHMB en agitación mecánica a 37°C durante 24h. Luego, se sacaron las muestras de los hidrogeles y se liofilizaron durante 48h.

2. Liberación de fármacos

Se realizó una liberación de la CHX y el PHMB en tres medios durante 8h para cada uno:

- a. Tampón fosfato salino PBS(9,55 g/L)
- b. Mezcla PBS/ETOH (30:70 v/v)
- c. Etanol absoluto(ETOH)

Inicialmente se liberó en PBS durante 8h. Después se cambió de medio a PBS/EtOH y finalmente EtOH.

4.5.3. **Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar**

Para verificar la carga del fármaco (CHX y PHMB) en el hidrogel y su actividad sobre las bacterias, se prepararon placas de agar. A partir de un medio semisólido propicio para el crecimiento bacteriano, añadiendo agar a un caldo de cultivo y dejándolo gelificar en el interior de una placa de Petri.

Para realizar el ensayo, deben esterilizarse las placas una vez el agar se encuentra en estado sólido con radiación UV-Vis. Posteriormente, se hace la siembra bacteriana (lo más homogénea posible) de una disolución que contiene 100 μ L de bacteria en 10 ml de caldo de cultivo, mediante un bastoncillo de algodón. Una vez hecha la siembra, se disponen sobre la superficie del gel las muestras cargadas con el fármaco y una muestra de ampicilina (10 μ L) usada como referencia. Las placas se incubarán durante 24h a 37°C.

4.5.4. **Adhesión y proliferación celular**

El estudio se ha llevado a cabo con células epiteliales de la con la línea SIAT, células

fibroblastos. Ambos tipos de células han sido cultivadas a 37°C y en una atmósfera húmeda (5% CO₂ y 95% de aire), en el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), adicionando un 10% de suero fetal bobino, 50 U/cm³ de penicilina, 50 mg/cm³ de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina. El medio de cultivo se debe renovar cada dos días, y para llevarse a cabo el subcultivo, las monocapas celulares se lavan con PBS y se les añade tripsina-EDTA (0,25%) durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, la actividad de la tripsina se detiene añadiendo medio de cultivo y se obtiene así una suspensión celular. Las células en suspensión se pudieron determinar por conteo celular en una cámara de Neubauer, usando el colorante azul Trypan, al 4%. Éste permite distinguir las células vivas de las muertas, que quedan coloreadas en azul tras la rotura de la membrana celular (permite la entrada del colorante).

Para llevar a cabo el ensayo, se ha trabajado con muestras de hidrogeles de 1cm², colocados sobre placas de poliestireno de cultivo compatibles con el cultivo celular (con un contenido determinado en proteínas), siendo esterilizadas previamente con radiación ultravioleta. Se tomaron alícuotas de 100 µL y depositado sobre las matrices, adheridas previamente a las placas de poliestireno mediante silicona apta para ensayos biológicos. La placa se incubó durante 60 minutos para facilitar la adhesión celular a la superficie de las matrices, y después se le añadió 1 mL de caldo de cultivo en cada pocillo de la placa.

La evaluación de la adhesión y proliferación celulares se llevó a cabo utilizando como reactivo el MTT. Éste método de ensayo permite detectar si existe algún agente citotóxico que afecte a las células, y se utiliza porque las células viables contienen deshidrogenasas, que convierten el reactivo MTT en una sal de formazán. Esta transformación se evidencia por la aparición de microcristales en el interior de las células y es cuantificable cuando éstos se disuelven y se realiza una lectura de absorbancia de la muestra; pues el número de células o concentración celular es proporcional a la absorbancia medida a 540 nm. Una vez llevado a cabo el cultivo celular, se han añadido 50 µL de MTT con una concentración de 3mg/cm³ al medio. Pasadas 4h, el medio se ha aspirado y desechado y se han trasladadoras probetas a una placa limpia. Finalmente, se ha añadido 1 cm³ de DMSO tanto a los pocillos vacíos como a los que contienen las muestras de las microfibras; de este modo, se ha podido cuantificar las células viables sobre la placa, así como sobre las microfibras. Las placas se han mantenido en agitación durante 15 min para disolver los cristales de la sal de formazán en el DMSO y se ha tomado la lectura de la absorbancia con el lector de placas ELISA. Los ensayos de adhesión celular se midieron al cabo de 24 h, mientras que los de proliferación celular al cabo de 72 h.



5. Resultados y discusión

5.1. Preparación de nanofibras del PGGA

5.1.1. Determinación del solvente óptimo para obtener una disolución de PGGA

Algunos aspectos previos que se deben tener en cuenta para realizar el electrospinning de un polímero son las características de su disolución: el polímero debe de ser de alto peso molecular, la disolución del polímero debe realizarse en un solvente orgánico volátil, la concentración de la disolución debe generar una viscosidad en el rango de moderada-alta, etc.

El ácido poli(γ -glutámico) o PGGA de bajo peso molecular (200,000-500,000 g/mol) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Japan) en su forma ácido-libre es una mezcla DL (D:L, 7:3) se caracteriza por su baja solubilidad en agua, y alta solubilidad en soluciones alcalinas (p.e. bicarbonato de sodio 0.05 M). Sin embargo, se desconoce exactamente su solubilidad en solventes orgánicos. Este hecho es una consideración previa que se ha tenido que resolver en este proyecto.

Por tal motivo, se ha realizado un estudio previo para determinar de manera cualitativa la solubilidad del PGGA en diferentes solventes orgánicos con la finalidad de preparar una disolución ad-hoc para su electrohilado. En la Tabla 5.1 se muestran los resultados de la solubilidad del PGGA en diferentes solventes orgánicos seleccionados por ser habitualmente usados en la técnica de electrospinning, o solventes orgánicos usados para la disolución de proteínas y péptidos. Los resultados demuestran que el PGGA ácido-libre es soluble en agua y bicarbonato de sodio de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Además, este cribado de solventes demuestra que el PGGA ácido-libre es soluble en ácido trifluoro acético (TFA) puro y al 5%-v/v. Esta solubilidad podría ser justificada desde que el PGGA es un polímero formado por enlaces peptídicos entre los grupos γ -carboxilo y α -amino. Además, la disolución de PGGA en TFA fue anteriormente reportada por algunos autores tales como Yoshida et al. [17] y Wang et al. [18].

En un ensayo adicional, el PGGA (0.5 g) fue disuelto en bicarbonato de sodio (4.5 mL) la disolución ocurre de manera rápida y con liberación de gas (liberación de pequeñas burbujas desde el sólido), la disolución resultante mostro aparentemente una elevada viscosidad; con la finalidad de disminuir la viscosidad se añadió 0.5 mL de TFA, luego de mantener esta disolución en agitación magnética durante 24 horas, el PGGA precipito (Tabla 5.1). Este resultado demuestra que el equilibrio de la forma ácido libre --COO^- y sal de sodio $\text{--COO}^- \text{Na}^+$ debe ser un factor importante para la solubilidad del PGGA.

Tabla 5.1. Pruebas de solubilidad para la selección de disolventes de PGGA. Los resultados son mostrados de forma cualitativa.

Solvente	Cantidades (PGGA/solvente)	Concentración (%-w/v)	Resultados
Acetonitrilo	0,25g/2mL	12.5	Insoluble
Cloroformo	0,25g/2mL	12.5	Insoluble
DMF: DCM (7:3)	0,25g/2mL	12.5	Insoluble
Cloroformo: Acetona (2:1)	0,25g/2mL	12.5	Insoluble
TFA 5%-wt	0,8g/5mL	16.0	Soluble
TFA puro	0,8g/5mL	16.0	Soluble
HFIP	0,8g/5mL	16.0	Insoluble
Ácido Acético (ac)	1g/5mL	20.0	Insoluble
DMSO	0,8g/5mL	16.0	Insoluble
Ácido Dicloroacético	0,8g/5mL	16.0	Insoluble
Bicarbonato de Sodio	1g/5mL	20.0	Soluble
Bicarbonato de Sodio + TFA	0,5g/4,5mL+0,5mL	10.0	Precipita
Agua	1g/5mL	20.0	Insoluble

Los ensayos de solubilidad llevados a cabo de manera cualitativa muchas veces no permiten discernir entre la insolubilidad y la solubilidad parcial del producto. Por ello, para el caso del PGGA se realizaron ensayos preliminares de electrospinning con la finalidad de establecer la presencia de pequeñas fibras o agujas y gotas de polímero, lo cual indicaría una solubilidad parcial y una insolubilidad del PGGA, respectivamente. Los resultados de estos ensayos previos son mostrados en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Pruebas de electrospinning de las diferentes muestras de disolución de PGGA en diferentes solventes. Los resultados son observados con un microscopio óptico (OM)

Solvente	¿Obtención de fibras?
TFA puro	Microfibras pero muy viscosa
TFA puro + 1 mL TFA 5%-wt	Nanofibras muy pequeñas en gotitas
HFIP	No
Ácido Acético (ac)	No
DMSO	No
Ácido Dicloroacético	No
Bicarbonato de Sodio	No porque no tiene carga
Agua	No porque no tiene carga



Como se puede observar en la Tabla 5.2, se obtuvieron microfibras sólo con la disolución de PGGA ácido-libre en TFA, y eso confirma lo que habíamos concluido anteriormente. Sin embargo, las fibras obtenidas con el TFA puro fueron muy viscosas, y con alta retención de solvente. Como alternativa para salvar este problema, se añadió a la disolución 1 mL de TFA en solución acuosa al 5%-wt, y se ensayo el electrospinning. Como resultado se obtuvieron nanofibras, pero dentro de pequeñas gotitas de polímero. Esto se puede explicar por la presencia del agua en la disolución acuosa de TFA que se añadió, el PGGA ácido-libre no es soluble en agua y en consecuencia no se puede obtener fibras porque ocurre una separación de fases (fase acuosa/ fase orgánica). De manera similar, se añadió 1 mL de TFA en ácido acético glacial al 5%-wt, obteniéndose el mismo resultado.

En conclusión, a partir de estos experimentos previos se establece que el PGGA ácido-libre es soluble en TFA puro, y que para su electrohilado, la disolución debe ser preparada con una concentración menor al 16%-w/v.

5.1.2. Determinación de los parámetros óptimos para el electrohilado

1. Concentración de la disolución polimérica: C

Como se explicó en el apartado 4.2.2.2., se realizó un ensayo con 5 muestras de diferentes concentraciones de PGGA ácido-libre en TFA para determinar la concentración polimérica óptima para el procesado de PGGA por electrospinning. En la Fig. 5.1, se observan las imágenes obtenidas por microscopía óptica de las fibras obtenidas por el electrohilado de las 5 muestras cuyas concentraciones fueron del 3%-wt, 5%-wt, 8%-wt, 11%-wt, y 13%-wt.

Se puede observar que en las imágenes de la Fig. 5.1a y 5.1e las fibras obtenidas en el electrospinning no son correctas. En efecto, en la Fig. 5.1a, la solución polimérica tiene una concentración muy baja de 3%-wt y esto hace que las fibras tengan diámetros muy pequeños alrededor de la escala nanométrica y además se observan gotas de solvente, ambas observaciones son debidas a la muy baja concentración de polímero. Al contrario, en la Fig. 5.1e, la concentración en PGGA es demasiada alta y como resultado se obtienen fibras muy gruesas y de aspecto vidrioso o húmedo debido a la retención de solvente.

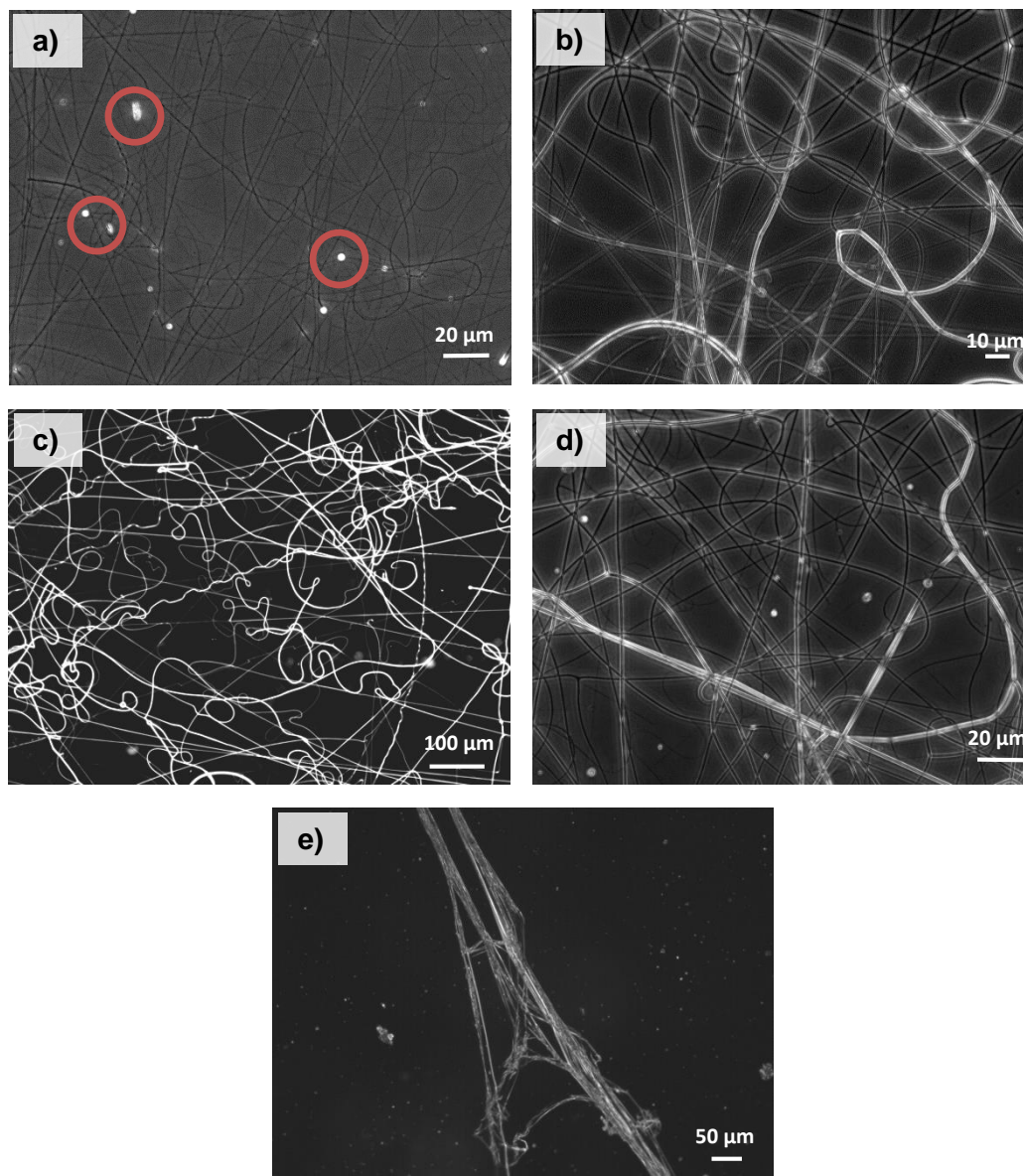


Fig. 5.1. Efecto de la concentración de PGGA en la formación de las electrofibras. Imágenes obtenidas por OM. Concentración de PGGA en TFA: a) 3%-wt, b) 5%-wt, c) 8%-wt, d) 11%-wt, e) 13%-wt.

En las imágenes de las Fig. 5.1b-d se observan fibras con morfologías correctas, fibras de forma cilíndrica y continua. Para continuar con el proceso de optimización del electrohilado se operó con estas tres concentraciones que corresponden al 8%, 11% y 13%-wt. Sin embargo, la concentración que aparentemente es más óptima podría corresponder a la disolución polimérica de PGGA al 8%-wt porque no se observan partículas sólidas o gotas de solvente



y las fibras tienen una morfología más rectilínea.

2. Distancia aguja-colector: d

La distancia aguja-colector es un parámetro operacional importante porque esta distancia corresponde a la distancia entre los polos en el cual se realiza el campo eléctrico. Además, representa el trayecto por el cual se desplazan las fibras para conseguir la evaporación del disolvente.

Como se indicó en la sección 4.2.2.2., el electrohilado se realizó teniendo en consideración dos distancias aguja-colector, una de 15 cm y otra de 25 cm. Ambas distancias fueron operadas con dos flujos para la disolución del PGGA (1 y 0,5 mL/h). En la Fig. 5.2 se muestran las imágenes de las fibras obtenidas en las condiciones anteriormente indicadas (dos distancias y dos flujos).

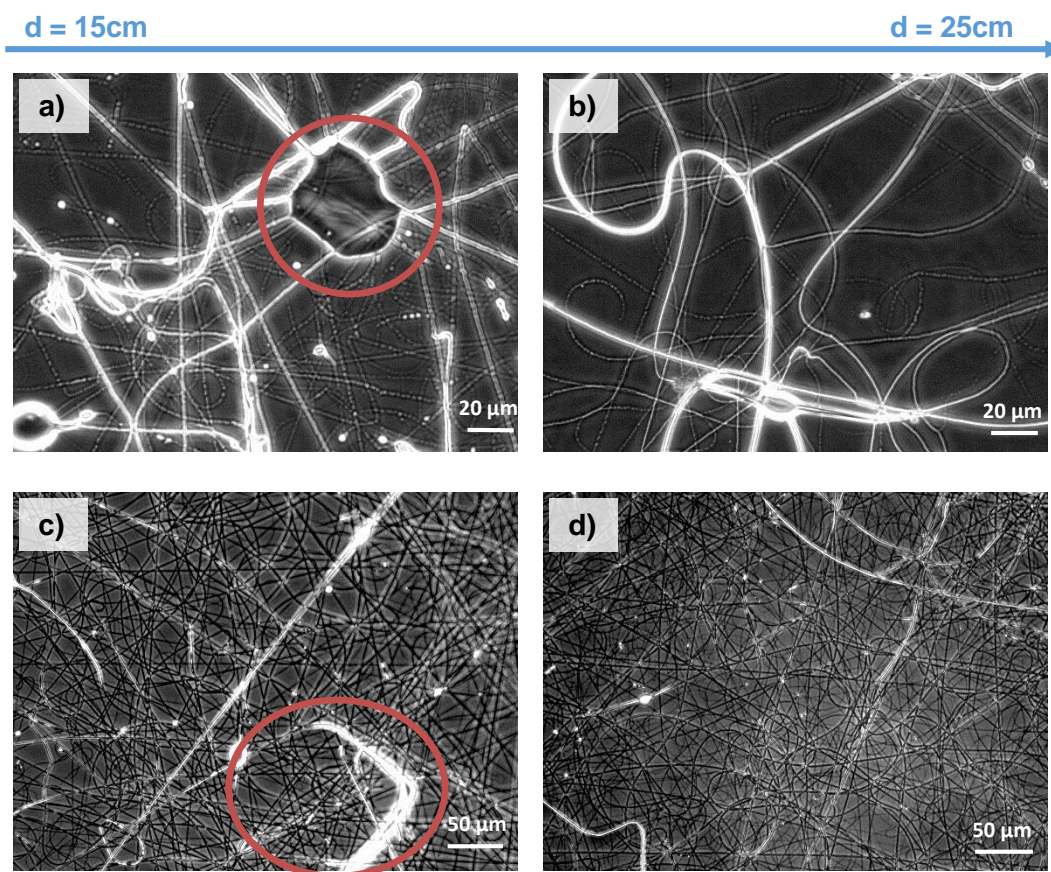


Fig. 5.2. Efecto de la distancia aguja-colector en la formación de las electrofibras. Imágenes obtenidas con OM. Distancia aguja colector (en cm) y Flujo de la disolución del polímero (en mL/h): a) $d=15$ cm y $F=1$ mL/h, b) $d=25$ cm y $F=1$ mL/h, c) $d=15$ cm y $F=0,5$ mL/h, d) $d=25$ cm y $F=0,5$ mL/h.

En las imágenes Fig. 5.2a y c se muestran fibras obtenidas con una distancia de 15 cm entre

la aguja-colector, y morfológicamente estas fibras no fueron correctas. De hecho, en la imagen de la Fig. 5.2a, se observa una gran gota de solvente (TFA puro) y en la Fig. 5.2c, se observa fibras con gran diferencia en sus diámetros, así esta gran heterogeneidad de diámetros supone inadecuadas condiciones operacionales de electrohilado. Esto puede ser explicado porque el campo eléctrico formado a estas distancias (15 cm) aguja-colector no son lo suficientemente fuertes para estirar la gota y formar el cono de Taylor. Por otro lado, los flujos másicos del polímero en disolución podrían ser excesivos para el campo electrostático, con lo cual se van acumulando fibras con diámetros excesivamente grandes.

En este sentido, cuando la distancia aguja-colector fue de 25 cm, (la cual corresponde a la máxima distancia en la conformación del equipo de electrospinning del laboratorio), no se observaron gotas del disolvente (Fig. 5.2b y d), estos resultados indicarían que la distancia óptima entre la aguja y el colector sería de 25 cm.

3. Tiempo de solubilización: t_d

Como se explicó en la sección 4.2.2.2., se prepararon muestras de PGGA ácido-libre usando 3 tiempos de solubilización (t_d) del polímero en TFA: 24h, 48h y 72h. Después de cada tiempo de solubilización, la fracción solubilizada fue electrohilada. No se observó formación de fibras con la muestra de $t_d=24h$ y en consecuencia no se presenta ningún registro de imágenes al OM para este tiempo de solubilización.

En la Fig. 5.3, se muestran las imágenes de las fibras obtenidas con los t_d de 48h y 72h a diferentes flujos de salida de la aguja (F). Se pueden observar partículas sólidas en las imágenes de las Fig. 5.3a, c y e, Siendo la Fig. 5.3e la que presenta mayor abundancia de estas partículas y corresponde a la muestra con un $t_d = 48 h$ y $F = 0.2 \text{ mL/h}$. Este flujo de salida fue el más lento y puede justificar que las fibras tuvieran diámetros en escala nanométrica, lo cual resalta la observación de una mayor cantidad de partículas. Así, las imágenes de las Fig. 5.3a, c y e claramente demuestran que el t_d de 48h no es suficiente para conseguir una concentración de PGGA ácido-libre adecuada en viscosidad para obtener una matriz de fibras sin partículas.



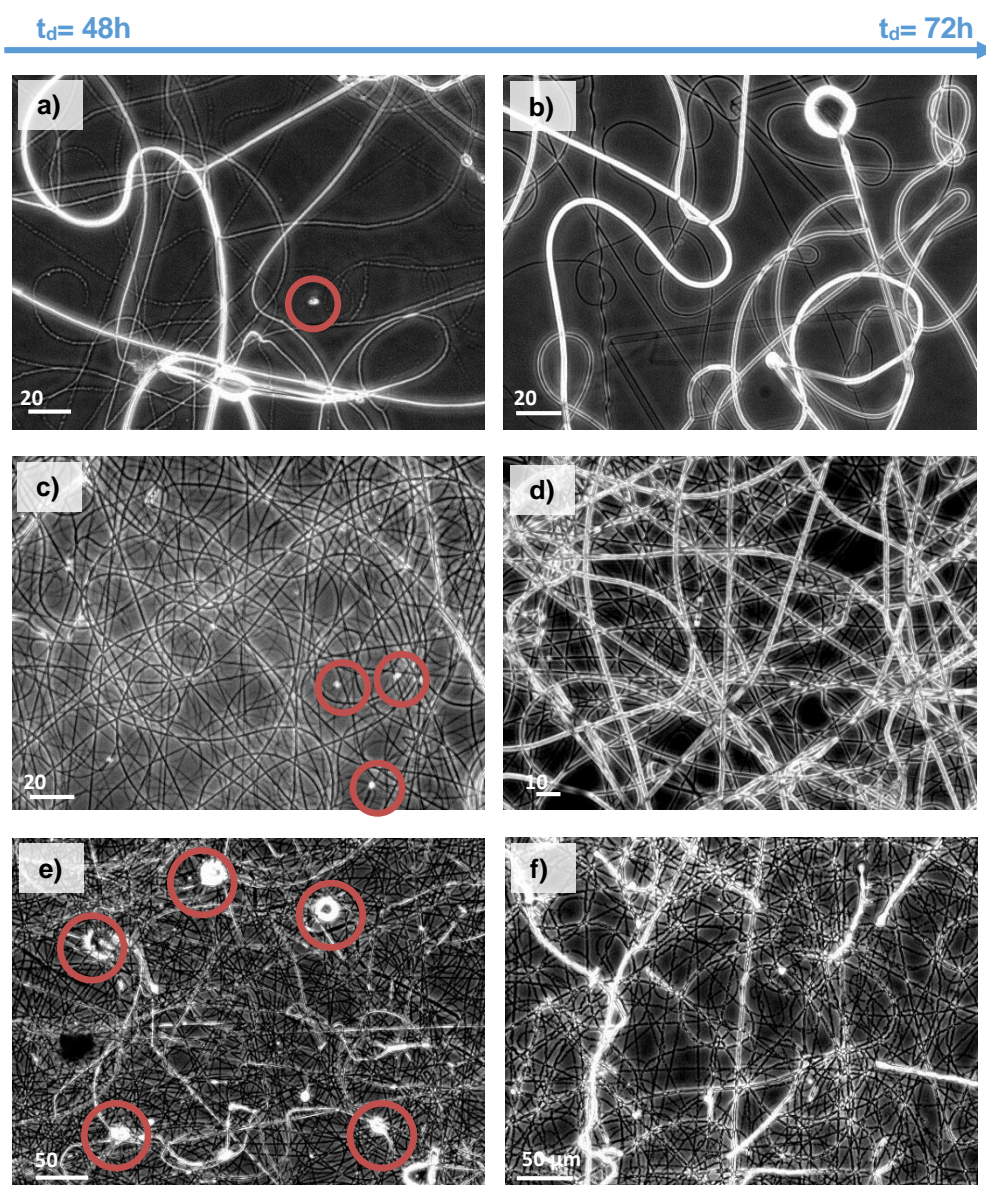


Fig. 5.3. Efecto del tiempo de solubilización (t_d) del PGGA ácido-libre para preparar una disolución electrohilable. Las fibras obtenidas fueron evaluadas por OM: a) $t_d=48h$ y $F=1mL/h$, b) $t_d=72h$ y $F=1mL/h$, c) $t_d=48h$ y $F=0,5mL/h$, d) $t_d=72h$ y $F=0,5mL/h$, e) $t_d=48h$ y $F=0,2mL/h$, f) $t_d=72h$ y $F=0,2mL/h$.

Por otro lado, las imágenes de las Fig. 5.3b, d y f no muestran partículas sólidas, y las fibras se observan muy regulares en su morfología y diámetro de fibras. A partir de estos resultados, se puede concluir que el tiempo de solubilización para el PGGA ácido-libre requerido es de al menos 72 h.

4. Flujo de salida: F

Como se explicó en la sección 4.2.2.2., la disolución del PGGA ácido-libre fue electrohilada con diferentes flujos de salida de la aguja (F). En la Fig. 5.4 se puede observar las imágenes de OM de las fibras obtenidas para cada flujo F. Para todas muestras, siempre se acumuló la misma cantidad de fibras.

Se puede observar en las imágenes de la Fig. 5.4a y b grandes y pequeñas gotas de disolvente, esto se debe al flujo de salida operado a elevada velocidad (1 mL/h). Así, operacionalmente el electrospinning fue realizado con flujos más bajos: 0,5 y 0,2 mL/h (Fig. 5.4c y d, respectivamente). Sin embargo, una mayor cantidad de fibras fue acumulada cuando el flujo fue de 0.5 mL/h en comparación al flujo de 0.2 mL/h. Finalmente, se concluyó que el flujo de 0,5 mL/h es el óptimo porque se obtendrá matrices de nanofibras más rápidamente.

En la Tabla 5.3, se puede observar una síntesis de todos los parámetros óptimos para realizar el electrospinning del PGGA ácido-libre. No se realizaron pruebas con diferentes potenciales eléctricos para hacer una optimización del voltaje aplicado, pero de manera constante siempre se aplicó 30 kV como lo habían hecho Yoshida et al. [17] y Wang et al. [18].

Tabla 5.3. Valores óptimos de los diferentes parámetros del electrospinning de PGGA ácido-libre para obtener matrices de nanofibras

Parámetro	Valor optimo
Concentración polimérica: C	8%-wt
Distancia aguja-colector: d	25 cm
Tiempo de solubilización: t_d	72 h
Flujo de salida: F	0,5 mL/h
Potencial eléctrico	30 kV



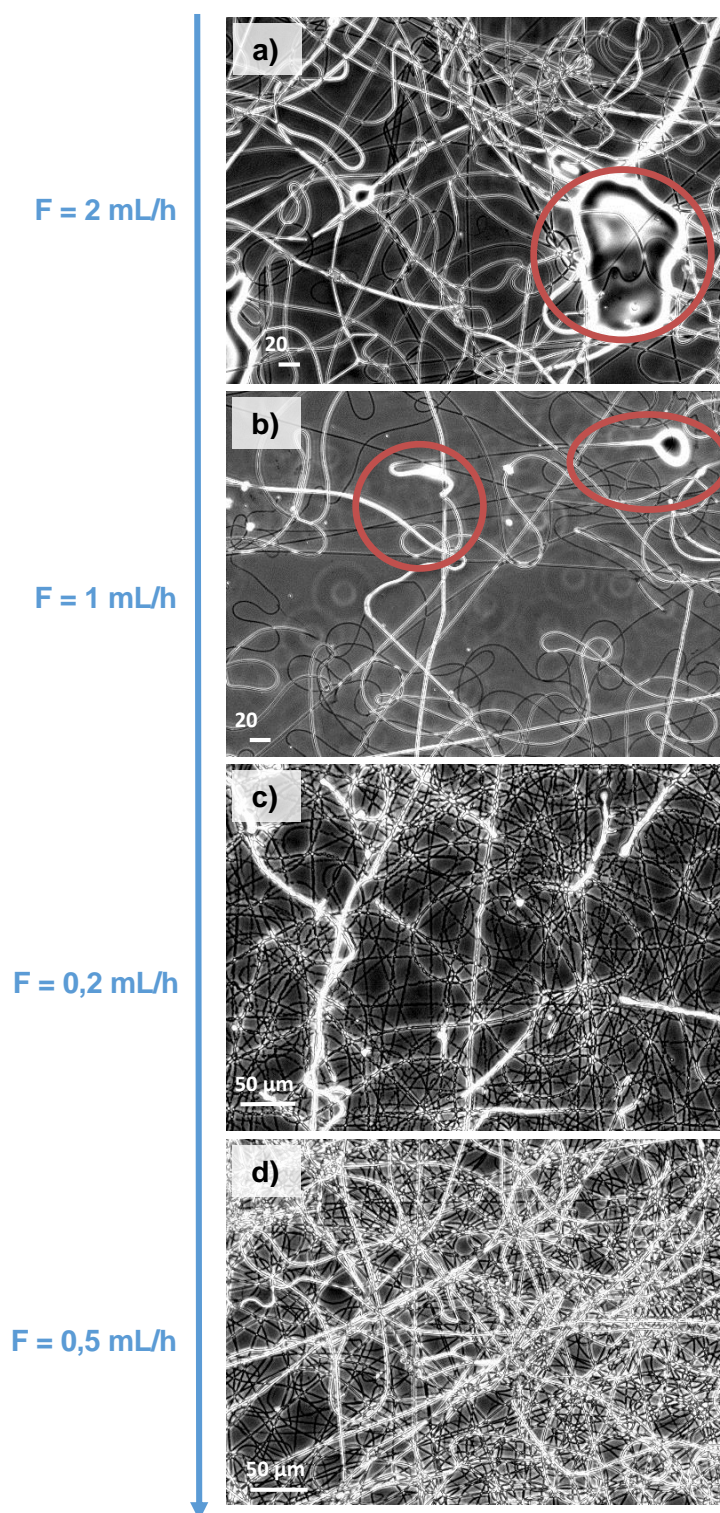


Fig. 5.4. Efecto del flujo de salida F en la formación de fibras de PGGG. Imágenes obtenidas por OM: a) 2mL/h, b) 1mL/h, c) 0,2mL/h, d) 0,5mL/h.

5.2. Caracterización de las fibras

Después de haber preparado las matrices de nanofibras de PGGA con los parámetros operacionales óptimos del electrospinning, las fibras fueron estudiadas por su morfología, hidrofobicidad y diámetro medio de las fibras. Las matrices de fibras fueron preparadas con diferente concentración polimérica (C): 5%-wt, 8%-wt, y 11%-wt.

5.2.1. Morfología

La morfología de las fibras fue analizada usando las imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido (SEM). A continuación se puede observar el efecto de la concentración polimérica (C) sobre la morfología de las fibras. Si comparamos las imágenes de las Fig. 5.5a, b y c se puede observar que a medida que aumenta la concentración C, se obtienen más fibras por unidad de flujo. Sin embargo, la superficie de las fibras no cambia con respecto a la concentración. Las fibras tienen siempre el mismo aspecto de fibras cilíndricas y lisas.

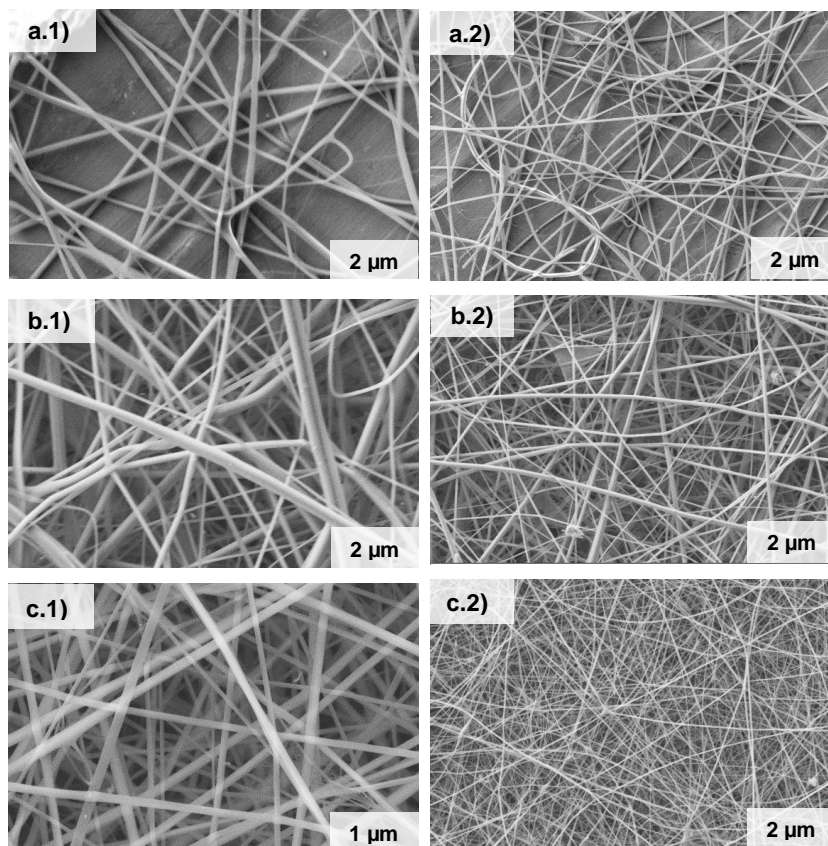


Fig. 5.5. Imágenes SEM: Efecto de la concentración polimérica (C) sobre la morfología de



las fibras: a) 5%-wt, b) 8%-wt, c) 11%-wt. Imágenes a mayor aumento (a1-c1) y menor aumento (a2-c2)

5.2.2. Diámetro de las fibras

Las imágenes de las fibras obtenidas mediante la técnica de SEM también fueron utilizadas con fines cuantitativos para realizar el análisis de la distribución de diámetros de las fibras. El diámetro medio de las fibras es una medida que da información sobre la homogeneidad y el espesor de las fibras en la matriz. El programa que se ha utilizado para medir el diámetro fue el *Smart Tiff* de libre distribución. Los valores medidos fueron tratados mediante el programa *Origin (Origin Pro v8. Microcal)* que permite calcular una distribución de diámetros y realizar las representaciones graficas de estas distribuciones (Fig. 5.6).

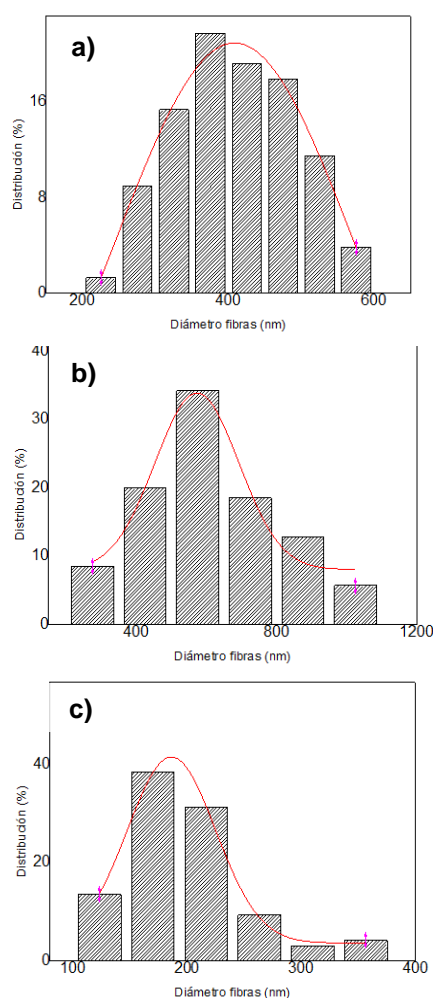


Fig. 5.6. Distribución de los diámetros de las fibras obtenidas a diferentes concentraciones poliméricas (C): a) 5%-wt, b) 8%-wt, c) 11%-wt

En la Tabla 5.4 se muestran los valores promedio de diámetro y su desviación estándar. Se puede observar que las fibras con mayor diámetro corresponden a las matrices obtenidas con una concentración polimérica inicial de 8%-wt. Cuando aumenta la concentración de PGGA, aumenta el diámetro de las fibras. Sin embargo, se ha obtenido un diámetro más pequeño con la concentración de 11%-wt, la cual corresponde a la mayor concentración estudiada. De hecho, esta matriz fue recogida con un flujo de salida de 0,3 mL/h porque era el óptimo para esta concentración. Así, la relación campo eléctrico y masa de PGGA es la misma que la de las dos otras matriz pero el flujo es más pequeño. Por esta razón, se obtienen fibras al 11%-wt con un diámetro más pequeño.

Tabla 5.4. Efecto de la concentración polimérica inicial (C) sobre el diámetro de las fibras

C inicial (%-wt)	Flujo optimo F utilizado (mL/h)	Ø fibras obtenidas (nm)
5	0,5	408 ± 3,5
8	0,5	572,5 ± 18,3
11	0,3	186,3 ± 0,9

5.2.3. Ángulo de contacto

El análisis de los ángulos de contacto permite determinar la hidrofobicidad de la superficie de las matrices de fibras. Las fibras de PGGA son solubles en agua por lo que resulta imposible determinar el ángulo de contacto en este medio como se observa en la Fig. 5.7. Sin embargo, más adelante este dato no permitirá verificar el entrecruzamiento de las fibras.

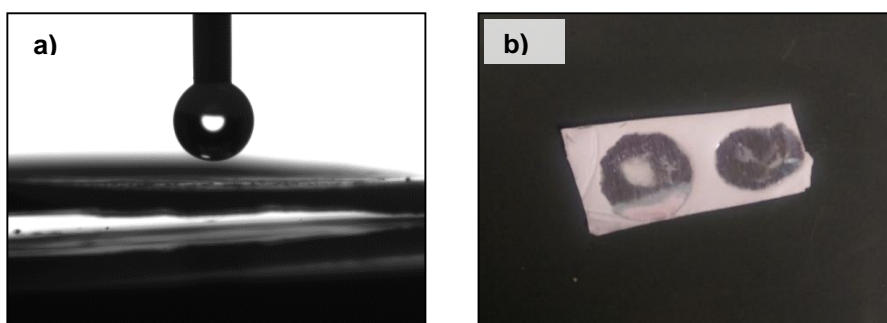


Fig. 5.7. Pruebas de medida de ángulo de contacto en las matrices de fibras de PGGA antes de la reacción de reticulación: a) imagen del OM, b) imagen de las matrices de fibras disueltas durante la medida.



5.3. Determinación del proceso óptimo de reacción de reticulación

Para determinar el procedimiento óptimo de reacción de reticulación, se realizaron diferentes ensayos. A continuación, se detallan estos diferentes ensayos indicando: las cantidades de reactivos, el procedimiento utilizado, los resultados y las conclusiones de cada ensayo.

Un primer ensayo fue realizado para comprobar si los reactivos y las cantidades que utilizan Wang et al. [18] y Yoshida et al. [17] podían ser aplicadas a nuestras condiciones experimentales. La reacción de reticulación del PGGA ha sido realizada en metanol por Wang et al. [18], pero Yoshida et al. [17] utilizaron etanol. Así, para seleccionar el disolvente más adecuado para esta reacción se procedió de la siguiente forma, se dejó secar dos disoluciones de PGGA en TFA para obtener dos filmes de PGGA: uno para probar la reacción con el metanol como disolvente y el otro con el etanol.

En la Tabla 5.5 se muestran las cantidades de reactivos que se colocaron, el procedimiento aplicado, así como los resultados y las conclusiones obtenidas.

Tabla 5.5. Ensayo 1: Reacción de reticulación probando dos disolventes (metanol y etanol)

Ensayo 1 : Reacción de reticulación probando dos disolventes con un film de disolución polimérica de PGGA		
Fecha prueba	10-feb	
Características muestras iniciales	film de solución polimérica de PGGA que se dejó secar para evaporar el disolvente TFA (<i>solvent casting</i>)	
	Referencia artículo de Wang et al.[18] y Yoshida et al. [17]	
Cantidades EDC y Cistamina	Metanol <ul style="list-style-type: none"> •6.3mg film •31.5mL MetOH •63mg EDC •63mgCistamina 	Etanol <ul style="list-style-type: none"> •4.6mg film •23mL EtOH •46mg EDC •46mg Cistamina
Solventes	Una prueba en EtOH y una prueba en MetOH	
Procedimiento	Se ponen todos los reactivos en un mismo vial durante 24h	
Resultados	El film se disolvió en el MetOH. La cistamina no se disolvió en el EtOH.	
Conclusiones	- Utilizar el EtOH para no disolver las fibras - Utilizar el MetOH para disolver la cistamina - Hacer la reacción en soluciones diferentes	

Después, se realizó un segundo ensayo probando en las matrices de nanofibras de PGGa. Se probó la reacción en las tres muestras de matrices de fibras (piezas de 0.5x0.5 cm aprox.) con diferentes concentraciones poliméricas: 5%-wt, 8%-wt y 11%-wt. Se utilizó el etanol como disolvente para que las fibras no se disuelvan. Pero, el problema fue que la cistamina no se disolvió en etanol y entonces la reacción no se efectuó para ninguna de las tres muestras. En la Tabla 5.6 se puede observar las cantidades de reactivos colocadas así como los resultados y las conclusiones del ensayo.

Tabla 5.6. Ensayo 2: Reacción de reticulación probando diferentes concentraciones poliméricas de nanofibras (5%-wt, 8%-wt y 11%-wt).

Ensayo 2 : Reacción de reticulación con capas de nanofibras de diferentes concentraciones poliméricas			
Fecha prueba	18-feb		
Características fibras iniciales	matrices de fibras de diferentes concentraciones poliméricas (5%, 8% y 11%-wt)		
Cantidades EDC y Cistamina	<i>Referencia artículo de Wang et al. [18]</i>		
	Fibras 5%-wt •6.6mg fibras •33mL EtOH •66mg EDC •66mg cistamina	Fibras 8%-wt •2.5mg fibras •12.5mL EtOH •25mg EDC •25mg cistamina	Fibras 11%-wt •2.3mg fibras •11.5mL EtOH •23mg EDC •23mg cistamina
Solventes	EtOH para las dos soluciones		
Procedimiento	1. Solución EDC (16h) 2. Solución Cistamina (24h) 3. Lavado en agua		
Resultados	- Las fibras se disolvieron en agua - La reacción con la cistamina no se efectuó porque no se disolvía en EtOH		
Conclusiones	- Disolver primero la cistamina en MetOH y después en EtOH - Recoger una matriz de fibras más gruesa		

Luego, se realizó una prueba de reacción con diferentes tiempos de reacción con la cistamina (t_r): 1, 3, 6, y 24 horas. Para realizarlo, se utilizó cuatro muestras de matrices de nanofibras con una concentración polimérica inicial de 11%-wt. Se preparó primero una solución madre de EDC y cistamina de 5mL y se tomó 1mL para cada muestra de fibras.



Con este ensayo hemos podido concluir que el tiempo óptimo de reacción de las matrices de PGGA con la cistamina fue de 6h. De hecho, en la muestra con un t_r de 6h se obtuvo un diámetro de fibras mayor cuando las muestras fueron evaluadas por SEM. A continuación se puede observar este ensayo más detallado (Tabla 5.7).



Tabla 5.7. Ensayo 3: Reacción de reticulación probando diferentes tiempos de entrecruzamiento (1h, 3h, 6h y 24h).

Prueba 3: Reacción con diferentes tiempos en la solución de cistamina (t_r)	
Fecha prueba	22-feb
Características fibras iniciales	muestra de matrices de fibras al 11%-wt
Cantidades EDC y Cistamina	<p><i>Referencia artículo de Yoshida et al. [17]</i></p> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> Solución madre 50mg EDC 50mg Cistamina 5mL Etanol </div> <div style="margin: 0 10px; font-size: 2em;">➔</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> 4 soluciones hijas con t_r diferente [EDC]=0.168M [Cistamina]=0.222M </div> </div>
Solventes	EtOH
Procedimiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparación solución madre 2. Preparación 4 solución hijas tomando 1mL de solución madre 3. Reacción con todos los reactivos durante diferentes tiempos (1h, 3h, 6h y 24h) 4. Lavado en EtOH
Resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Las fibras se disolvieron en agua - Diámetro de fibras en el hidrogel es mayor para la muestra de 6h de reacción
Conclusiones	Tiempo óptimo de reacción en la solución de cistamina: 6h

Debido a que la reacción del ensayo 3 tampoco se efectuó utilizando etanol como disolvente, se decidió emplear una mezcla metanol/etanol. De hecho, las conclusiones del ensayo 1 (Tabla 5.5) fueron de utilizar el metanol para disolver la cistamina pero sin embargo, las fibras se disuelven en metanol. Entonces, el porcentaje óptimo de mezcla metanol/etanol para disolver la cistamina y no disolver las fibras fue de (35:65, v:v). Así, se realizó un ensayo con fibras para probar la reacción de entrecruzamiento disolviendo la cistamina en una solución MetOH/EtOH al 35:65, y la reacción se realizó para que las fibras no se disuelvan posteriormente en agua.

Se puede observar en la Tabla 5.8 las dos pruebas realizadas con esta solución MetOH/EtOH (35:65, v:v). En la Tabla 5.8 se muestran los resultados obtenidos a pequeña escala (indicados como 29-feb, y realizados con muestras de 0.5x0.5 cm aprox.) y a una escala 10 veces más grande (experimentos indicados como 08-mar).

Tabla 5.8. Ensayo 4 y 5: Reacción de reticulación probando una solución MetOH/EtOH (35:65, v:v) para disolver la cistamina


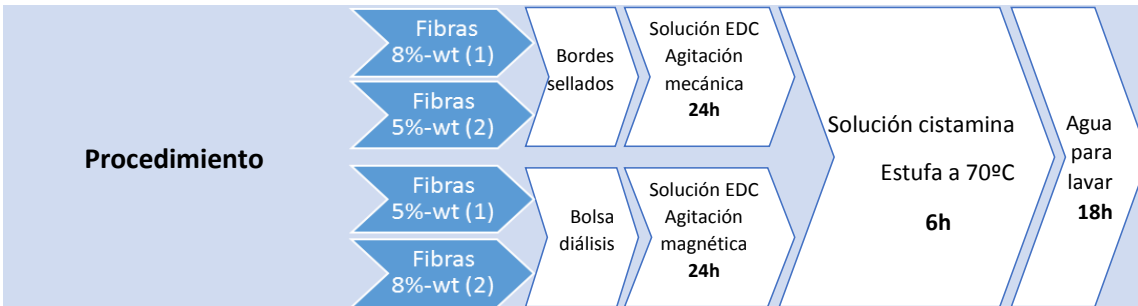
Prueba 4 y 5 : Reacción utilizando una mezcla MetOH/EtOH (35:65) para disolver la cistamina				
Fecha prueba	29-feb		08-mar	
Características fibras iniciales	muestra de fibras al 8%-wt		muestra de fibras a 5%-wt y 8%-wt	
Cantidades EDC y Cistamina	Referencia artículo Yoshida et al. [17]		Referencia artículo Yoshida et al. [17]	
	Solución EDC	Solución Cistamina	Solución EDC	Solución Cistamina
	<ul style="list-style-type: none"> •1.5mg fibras •10mg EDC •1mL EtOH 	<ul style="list-style-type: none"> •Fibras •10mg Cistamina •350 µL MetOH + 650 µL EtOH 	<ul style="list-style-type: none"> •15mg fibras •100 mg EDC •10mL EtOH 	<ul style="list-style-type: none"> •Fibras •100mg Cistamina •3.5mL MetOH+6.5mL EtOH
Solventes	EtOH para el EDC Mezcla MetOH/EtOH (35:65, v:v) para Cistamina			
Procedimiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solución EDC (24h) 2. Solución Cistamina (24h), 70°C 3. Lavado en agua 			
Resultados	<p>- Las fibras no se disolvieron en agua</p> <p>- Diámetro fibras se duplico después reacción</p>  <p>Fibras no disueltas en agua</p>		<p>- Las fibras al 5%-wt se hincharon en agua y las fibras al 8% se disolvieron en agua</p>  <p>Fibras al 5%-wt hinchadas en agua</p>	
Conclusiones	Hacer el mismo procedimiento pero a una escala 10 veces más grande		<p>- Hacer una matriz de fibras en 3D y poner las fibras en una bolsa de diálisis para la reacción</p> <p>- Dejar solo 6h en solución cistamina</p>	





Se puede observar en la Tabla 5.8 que la prueba escalada a una matriz de fibras de 5x5 cm aprox. no funcionó porque las fibras se hincharon demasiado o se disolvieron en el agua. De hecho, la muestra de fibra era solo una pequeña capa fina de nanofibras. Entonces, se decidió probar otra reacción con muchas capas de nanofibras apiladas para tener una muestra en 3D que sea más gruesa.

En un siguiente ensayo (Tabla 5.9, ensayo 6), se decidió probar la reacción con muchas capas apiladas de 1cm² de las matrices de nanofibras. Para ello, en una muestra se procedió al sellado de los bordes de las pilas de fibras, y con otra muestra, las pilas de fibras fueron colocadas dentro de una bolsa de diálisis para que las capas se mantengan juntas en la solución. Tal como en los ensayos 4 y 5 se utilizó una mezcla MetOH/EtOH (35:65, v:v) para disolver la cistamina. En la Tabla 5.9 se puede observar los resultados obtenidos. Este ensayo funcionó solamente con las muestras de fibras que tenían los bordes sellados.

Tabla 5.9. Ensayo 6: Reacción de reticulación probando con muchas capas de fibras apiladas con los bordes sellados o en una bolsa de diálisis

Ensayo 6: Reacción con muchas capas de fibras apiladas, sellando los bordes o poniéndolos en una bolsa de diálisis			
Fecha prueba	14-mar		
Características fibras iniciales	Muchas capas de fibras al y 8%-wt: 1. con los bordes sellados 2. en una bolsa de diálisis		
Cantidades EDC y Cistamina	Referencia artículo de Yoshida et al. [17] respecto al peso de cada muestra de fibras		
Solventes	- EtOH para el EDC - Mezcla MetOH/EtOH (35:65, v:v) para Cistamina		
Procedimiento	 <pre> graph LR subgraph Fibras F1[Fibras 8%-wt (1)] F2[Fibras 5%-wt (2)] F3[Fibras 5%-wt (1)] F4[Fibras 8%-wt (2)] end subgraph B1 [Bordes sellados] B1_in[Fibras 8%-wt (1) + 5%-wt (2)] end subgraph B2 [Bolsa diálisis] B2_in[Fibras 5%-wt (1) + 8%-wt (2)] end B1_in --> EDC1[Solución EDC Agitación mecánica 24h] B2_in --> EDC2[Solución EDC Agitación magnética 24h] EDC1 --> Cist[Solución cistamina Estufa a 70°C 6h] EDC2 --> Cist Cist --> Agua[Agua para lavar 18h] </pre>		


Resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Las fibras en la bolsa de diálisis se disolvieron durante la reacción - Las fibras con los bordes sellados no se disolvieron en agua 	
	Hidrogel obtenido con la muestra al 8%-wt (1) 	Hidrogel Obtenido con la muestra al 5%-wt (2) 
Conclusiones	Hacer el mismo procedimiento sellando los bordes de las capas fibras con muchas hojas de nanofibras (escalado)	

Finalmente, se realizó un último ensayo para probar la reacción con diferentes porcentajes de entrecruzamiento (%E) y sellando los bordes de las capas de fibras apiladas (Tabla 5.10). Para realizar esta reacción se utilizó como referencia las cantidades según Yoshida et al. [17]. Respecto al número de moles en cada muestra de fibras. Se puede observar estos cálculos en la sección 4.3.2.2. El procedimiento de este ensayo fue el más adecuado porque todos los hidrogeles obtenidos se hincharon en agua con una cierta tasa de hinchamiento; y esto significa que la reacción se efectuó en todas las muestras.

Tabla 5.10. Ensayo 7: Reacción de reticulación probando diferentes porcentajes de entrecruzamiento (%E): 50%, 75% y 100%.

Ensayo 7 : Reacción con diferentes porcentajes de entrecruzamiento (%E)	
Fecha prueba	19-abr
Características fibras iniciales	Muchas capas de fibras al 8%-wt con los bordes sellados
Cantidades EDC y Cistamina	Referencia artículo de Yoshida et al.[17] respecto al número de moles en cada muestra de fibras (ver sección 4.3.2.2.) Se prueban 3 %E: 50%, 75% y 100%
Solventes	<ul style="list-style-type: none"> - EtOH para el EDC - Mezcla MetOH/EtOH (35:65) para Cistamina



Procedimiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solución EDC (24h), agitación mecánica 2. Solución Cistamina (6h), 70°C 3. Agua para lavar (24h + 72h), agitación mecánica 4. Liofilización para secar los hidrogeles
Resultados	<p>Los hidrogeles se hincharon en agua y no se disolvieron</p> 
Conclusiones	PROCEDIMIENTO OPTIMO

Para resumir, en la Fig. 5.8 se muestra el proceso óptimo para realizar la reacción de entrecruzamiento de las nanofibras de PGGA en una matriz obtenida por electrospinning.

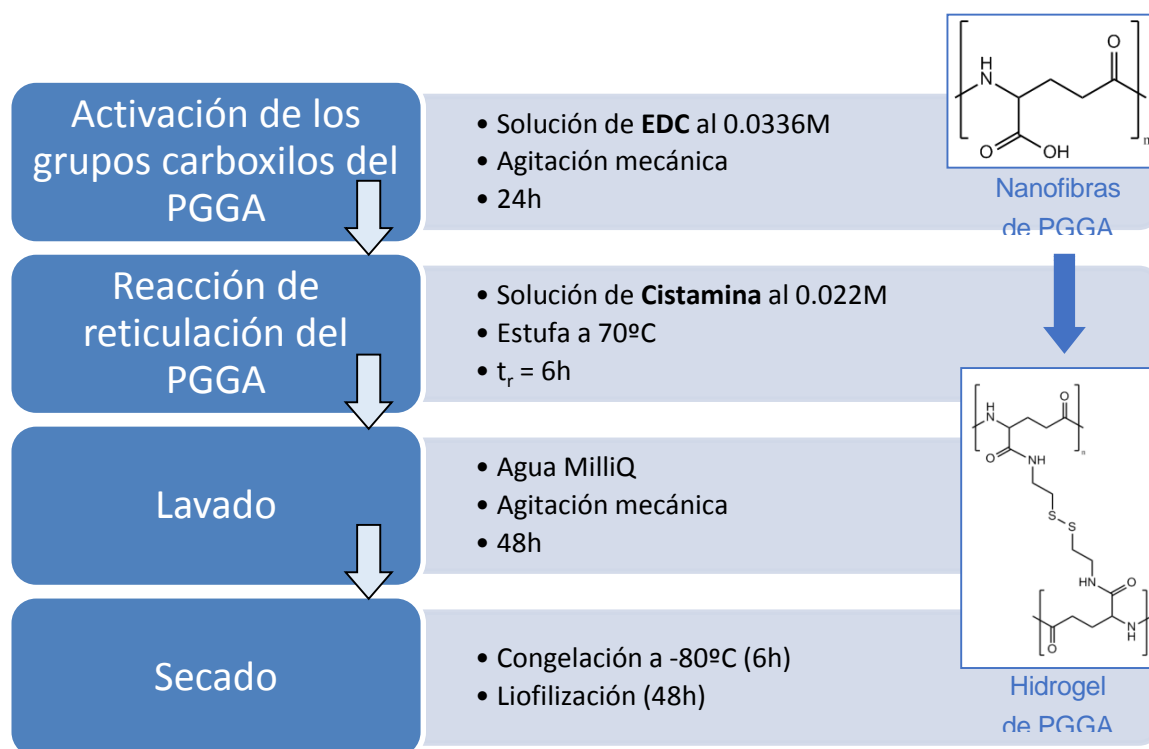


Fig. 5.8. Proceso óptimo de reacción de reticulación de las nanofibras de PGGA

5.4. Caracterización de los hidrogeles obtenidos

Con el proceso óptimo de reacción de reticulación de nanofibras de PGGA, hemos podido obtener muchos hidrogeles con diferentes porcentajes de entrecruzamiento (50%, 75 % o 100%). Estos hidrogeles se pueden caracterizar mediante su tasa de hinchamiento, su morfología y su diámetro de fibras, las cuales se miden en las imágenes de SEM.

5.4.1. Tasa de hinchamiento

La tasa de hinchamiento se puede calcular para cada hidrogel con la siguiente ecuación (Ec. 5.1):

$$tasa\ hinchamiento(\%) = \frac{(P_h - P_s)}{P_s} \times 100 \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Donde P_h y P_s corresponden al peso del hidrogel húmedo después del lavado en agua y al peso del hidrogel seco después de liofilizar, respectivamente.

A continuación (Tabla 5.11) se pueden observar los resultados de la tasa de hinchamiento obtenidos para cada muestra. Se calculó el promedio de la tasa de hinchamiento para los hidrogeles con el 50%, 75% y 100% de entrecruzamiento, y que corresponden a los valores indicados en la Tabla 5.11 como (1), (2) y (3), respectivamente.

Tabla 5.11. Tasa de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos con el proceso óptimo de reacción (exp. 19-abr).

Muestras	Peso muestra antes reacción (mg)	%E	P_h (mg)	P_s (mg)	Tasa de hinchamiento (%)
1 (1)	60,8	50	128,7	25,4	407
1 (2)	71	75	132,9	22,9	480
1 (3)	57	100	116,0	19,4	498
1 (4)	47,1	50	60,3	14,9	305
2 (1)	57,2	50	119,4	20,1	494
2 (2)	66,7	75	142,0	13,2	976 ¹
2 (3)	63,3	100	121,7	23,9	409
2 (4)	55,8	50	65,4	17,5	274



¹ Este valor queda fuera del intervalo de confianza para calcular el promedio de la tasa de hinchamiento (2) de las muestras con un 75% de entrecruzamiento



3 (1)	60	50	97,3	13,2	637
3 (2)	98	75	186,6	36,8	407 ²
3 (3)	52,9	100	92,4	12	670
3 (4)	47,5	50	47,3	11,4	315
4 (1)	82,6	50	150,8	17,2	777
4 (2)	67,5	75	101,2	14	623
4 (3)	90	100	141,0	14,3	886 ³
4 (4)	37	50	46,1	7	559
5 (1)	63,9	50	120,4	18,4	554
5 (2)	63,9	75	123,7	17,7	599
5 (3)	57,8	100	94,4	15	529
5 (4)	19,7	50	4,6	<i>No queda nada de muestra</i>	

Tasa media de hinchamiento (%)	
(1) 50%E	574
(2) 75%E	567
(3) 100%E	527

Las muestras (4) fueron primero utilizadas como blanco de la reacción con el fin de tener una comparación para los futuros ensayos biológicos. Así, las muestras (4) fueron puestas en etanol al 98% y después en una mezcla de MetOH/EtOH (35:65, v:v). Sin embargo, más adelante estas muestras fueron reticuladas al 50% (ensayo del 10-mayo). Por esta razón, las muestras (4) no muestran una tasa de hinchamiento del mismo orden que las muestras (1) y debido a estas diferencias en los procesos de reticulación las muestras (4) no fueron incluidas en el cálculo del valor promedio de hinchamiento para la muestra (1).

Se observa en la Tabla 5.11 que cuando el porcentaje de entrecruzamiento aumenta, la tasa de hinchamiento de los hidrogeles disminuye. Esto se puede explicar porque cuanto más reticulado sea un hidrogel, menos espacios tendrá en su matriz para que el agua acceda a su interior, y como consecuencia se hincha menos.

En posteriores experimentos de entrecruzamiento (exp. 10-mayo), las matrices de fibras fueron entrecruzadas al 50%, y los resultados son mostrados en la Tabla 5.12. Para estas muestras se obtuvo una mayor variabilidad en el grado de hinchamiento de las fibras, con valores en el rango de 582% a 1560%. Las tasas de hinchamiento de las muestras 6 (4), 6 (5) y 7 (1) fueron muy altas. Esto es debido al peso de los hidrogeles secos, el cual es muy

^{2,3} Estos valores quedan fuera del intervalo de confianza para calcular el promedio de la tasa de hinchamiento (2) y (3) de las muestras con un 75% y 100% de entrecruzamiento.

bajo (0,7; 0,5 y 2,3 mg). Además, se observó que estas tres muestras se disolvieron mucho al lavarlas con agua, es por esto que sus pesos fueron muy bajos.

Tabla 5.12. Tasa de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos con el proceso óptimo de la reacción de entrecruzamiento (exp. del 10-mayo)

Muestras	Peso muestra antes reacción(mg)	%E	P _h (mg)	P _s (mg)	Tasa de hinchamiento (%)
6 (1)	32,8	50	49,8	7,3	582
6 (2)	49,9	50	51	6,3	710
6 (3)	34	50	42,2	5,6	654
6 (4)	45,4	50	8,2	0,7	1071
6 (5)	37,1	50	8,3	0,5	1560
7 (1)	71,3	50	28,2	2,3	1126
7 (2)	44,3	50	20,8	2,3	804
7 (3)	21,4	50	13	1,5	767

5.4.2. Morfología y diámetro de las fibras de los hidrogeles

La morfología de los hidrogeles fue analizada mediante las imágenes de SEM. A continuación se podrá observar la morfología y el diámetro de las fibras de los hidrogeles según el tiempo de reacción t_r , según su preparación (p.e. haciendo uso o no de una bolsa de diálisis), y según el porcentaje de entrecruzamiento (%E).

1. Efecto del tiempo de reacción t_r (ensayo 3)

El tiempo de reacción (t_r) corresponde al tiempo en que las matrices de fibras se mantienen en la solución de cistamina (ensayo 3). Para ello, se realizó la reacción de reticulación probando diferentes tiempos en la solución de cistamina. En la Fig. 5.9 se muestran las imágenes de los hidrogeles obtenidos a diferentes tiempos t_r . Se observa que a medida que el tiempo de reacción aumenta, los hidrogeles parecen más entrecruzados. Sin embargo, el hidrogel obtenido con un t_r de 24h (Fig. 5.9d) no parece muy entrecruzado. Esto puede deberse a que la solución de cistamina fue preparada en una mezcla MetOH/EtOH (35:65, v:v) y a tiempos de reacción demasiado largos las fibras de los hidrogeles empiezan a disolverse en dicha mezcla. Ya que como se observó en la Tabla 5.5 (ensayo 1), las fibras se disuelven en el metanol.



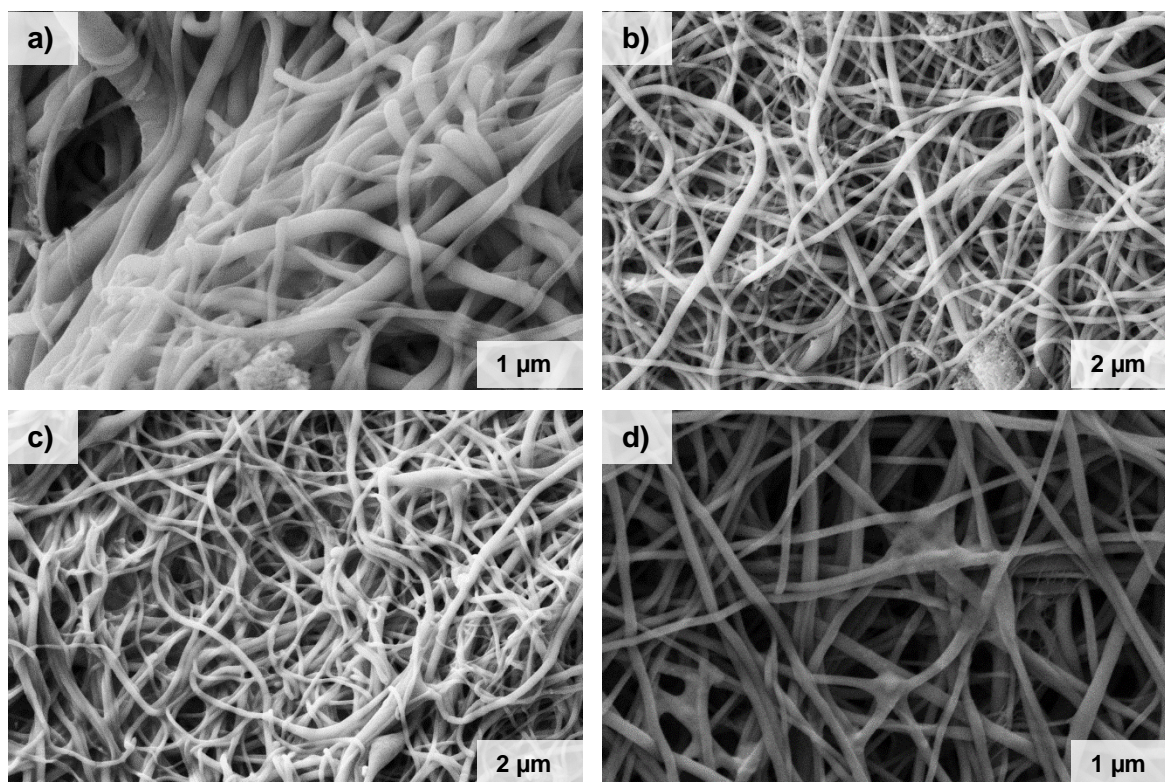


Fig. 5.9. Imágenes SEM de hidrogeles obtenidos a diferentes t_r con la disolución de cistamina: a) 1h, b) 3h, c) 6h, d) 24h. (ensayo 3).

En la Fig. 5.10 se puede observar la distribución de los diámetros de las fibras de los hidrogeles obtenidos. En general se observa que la distribución de las medidas de los diámetros pueden ser ajustados a modelos Gaussianos, cuyo máximo de la distribución corresponde al valor promedio del diámetro de las fibras.(Tabla 5.13)..

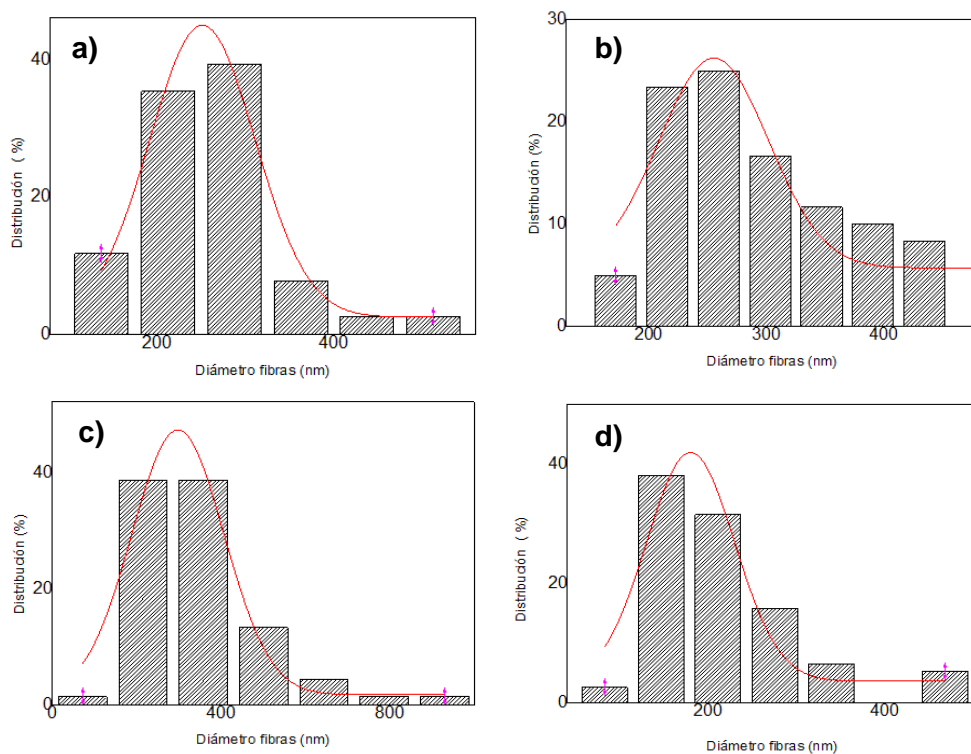


Fig. 5.10. Distribución de los diámetros de las fibras de los hidrogeles obtenidos a diferentes tiempos de reacción t_r en la disolución de cistamina: a) 1h, b) 3h, c) 6h, d) 24h (ensayo 3).

En la Tabla 5.13 se muestran los valores promedio de diámetro y su desviación estándar. Se puede observar que el diámetro de los hidrogeles aumenta con el tiempo de reacción, cuando el tiempo de reacción es más largo, los hidrogeles se entrecruzan más, excepto para la muestra obtenida a 24h, que como se observó en las imágenes de SEM tienen un comportamiento diferente y muestra un diámetro más pequeño en comparación a las fibras antes de la reacción. Este comportamiento ha sido explicado debido a la disolución parcial de las fibras en la disolución de cistamina. Finalmente, y de acuerdo a estos resultados, el tiempo óptimo de reacción en la disolución de cistamina fue de 6 horas mostrando un incremento del 59% en el diámetro de las fibras en comparación al incremento del 35-37% que se observó para los t_r de 1 h y 3 h, respectivamente.



Tabla 5.13. Efecto del tiempo de reacción en cistamina (t_r) sobre el diámetro de las fibras de los hidrogeles

t_r (h)	\varnothing fibras antes reacción (nm)	\varnothing hidrogeles (nm)	Relación de \varnothing
1	186,3 \pm 0,9	251,5 \pm 4,4	1,35
3		255,3 \pm 11,8	1,37
6		297 \pm 13	1,59
24		179,6 \pm 10,1	0,96

La tasa de hinchamiento de estos hidrogeles (ensayo 3) no pudo determinarse porque estos hidrogeles se desensamblaron en agua lo que indico que no estaban 100% entrecruzadas, o que la presión hidrostática de las fibras hinchadas ejerce una fuerza superior al grado de entrecruzamiento de las fibras en estas matrices.

2. Efecto de sellar los bordes o de utilizar una bolsa de diálisis para evitar la dispersión de las fibras (ensayo 6)

La dispersión de las fibras hinchadas en los hidrogeles ocasionan diferentes problemas, tal como, no es posible evidenciar los cambios físicos en las matrices de fibras, no se puede determinar un porcentaje de hinchamiento, etc. Como soluciones a este problema se ensayaron dos diferentes alternativas (ensayo 6), se realizó la reacción de entrecruzamiento probando de poner las capas de fibras apiladas en una bolsa de diálisis para que las fibras no se dispersen en la solución. También se probó de sellar los bordes de las capas de fibras apiladas.

En la Fig. 5.11 se pueden observar las imágenes SEM de los hidrogeles que se obtuvieron en este ensayo. Se observa que los hidrogeles obtenidos sellando los bordes (Fig. 5.11a y b) están más compactos que los hidrogeles obtenidos en una bolsa de diálisis (Fig. 5.11c), lo que favorece la manipulación de los hidrogeles. Además, las muestras obtenidas a partir de la bolsa de diálisis se disolvían al estar dispersas. Claramente, se observa que las fibras de la Fig 5.11a y b mantienen la estructura de una de una matriz de fibras. Sin embargo, en la Fig 5.11c se observa una estructura con agujeros y a mayor aumento puede evidenciarse la presencia de algunas fibras dentro de un material disuelto o laminado que se asemeja a un film.

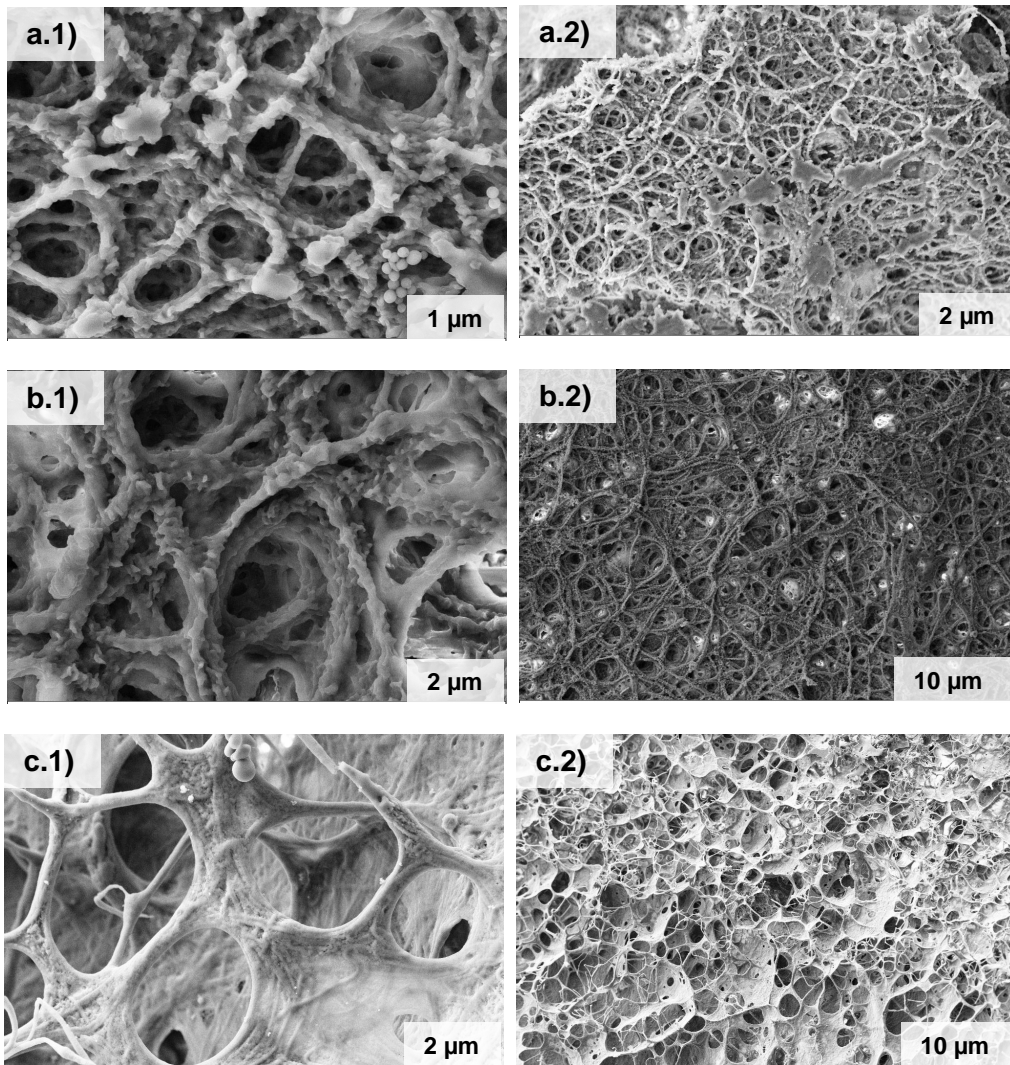


Fig. 5.11. Imágenes SEM de hidrogeles entrecruzados: a) sellando los bordes ($C = 5\text{-wt}$), b) sellando los bordes ($C = 8\text{wt}$), c) poniendo en una bolsa de diálisis ($C = 8\text{-wt}$). Imágenes a la izquierda ampliadas. (ensayo 6)

3. Efecto del porcentaje de entrecruzamiento (%E) (ensayo 7)

El efecto del porcentaje de entrecruzamiento sobre la morfología y el diámetro de las fibras de los hidrogeles fue evaluado (ensayo 7). En la Fig. 5.12 se puede observar las imágenes de SEM de los hidrogeles obtenidos a diferentes porcentajes de entrecruzamiento (50%, 75%, y 100%). Se observa una gran diferencia entre las muestras de los hidrogeles (Fig. 5.12b, c y



d) en comparación con la muestra inicial de fibras sin entrecruzar (Fig. 5.12a), estos resultados indican que el entrecruzamiento se ha llevado a cabo. Las imágenes de SEM de la Fig 5.12b-d, no muestran una gran diferencia entre ellas, sin embargo, se puede observar que el espacio entre las fibras del hidrogel es menor a medida que aumenta el entrecruzamiento: $100\% < 75\% < 50\%$. Este efecto es también evidente en las medidas del diámetro de las fibras del hidrogel (ver Tabla 5.14.).

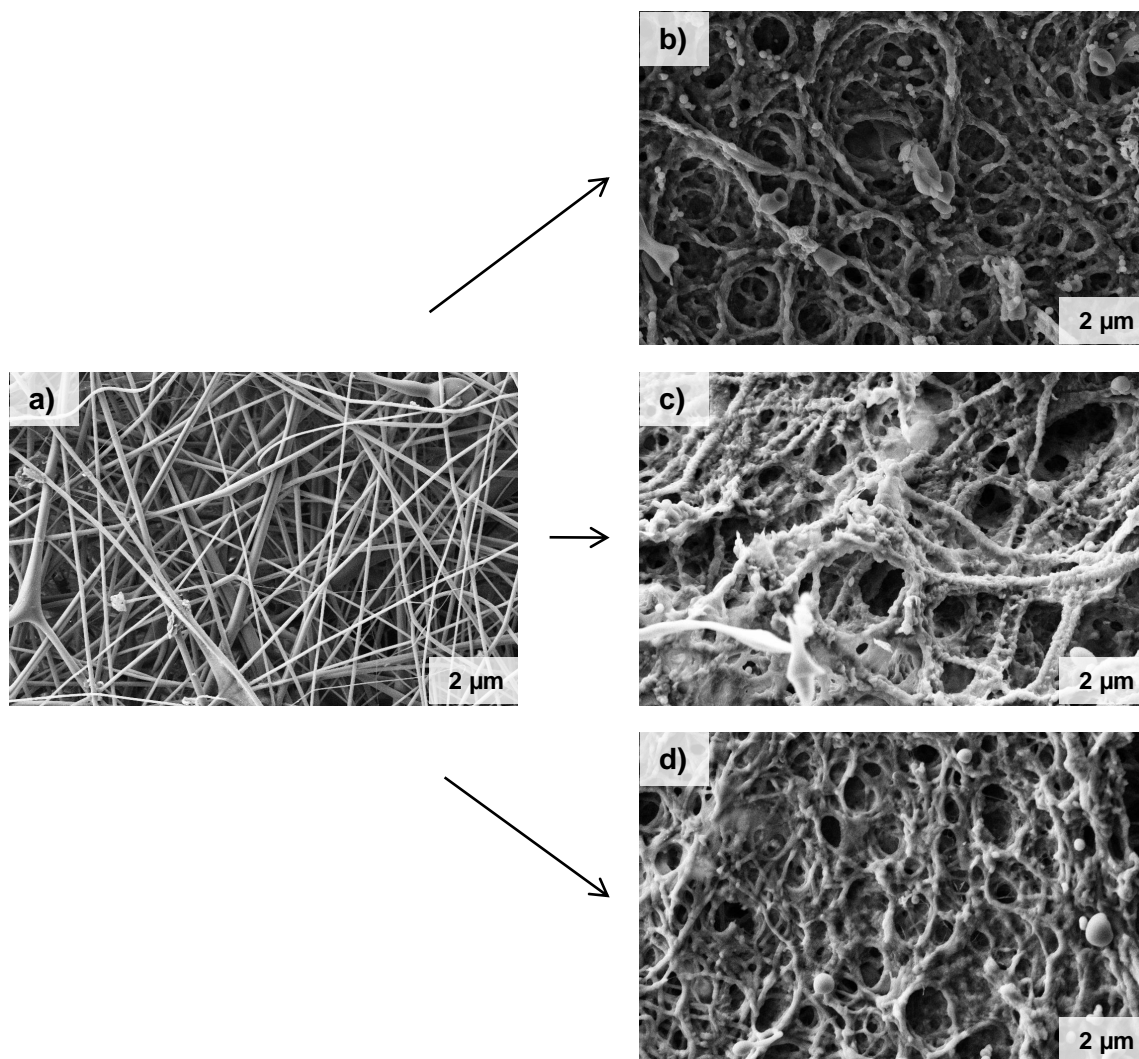


Fig. 5.12. Imágenes SEM de fibras e hidrogeles preparados con diferentes %E: a) Fibras antes de la reacción, b) Hidrogel 50 %E, c) Hidrogel 75 %E, d) Hidrogel 100 %E. (ensayo 7)

En la Fig. 5.13 se puede observar la distribución de los diámetros de fibras de los hidrogeles obtenidos con los diferentes grados de entrecruzamiento. En todos los casos se observó una distribución normal o de tipo Gaussiana.

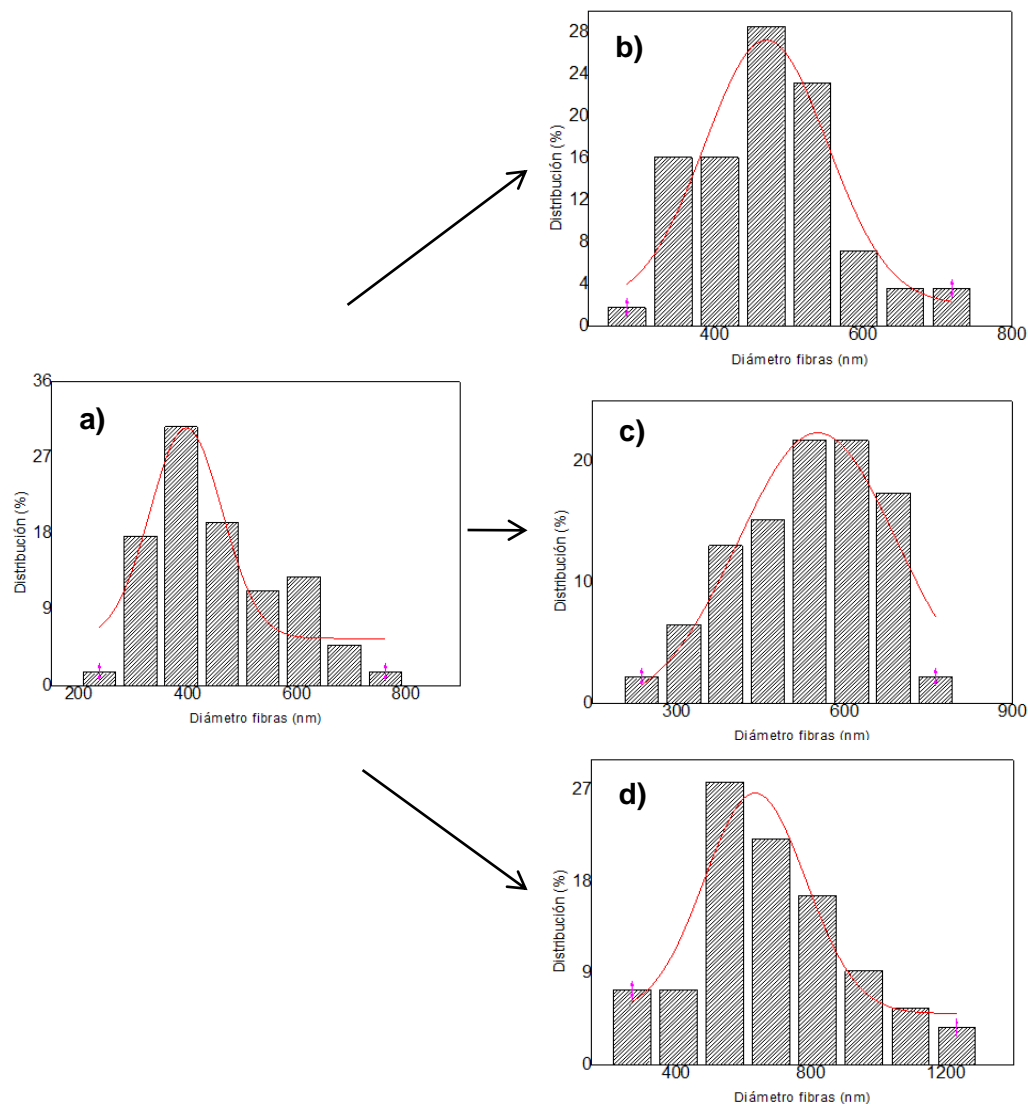


Fig. 5.13. Distribución de los diámetros de fibras de los hidrogeles obtenidos con diferentes %E: a) Fibras antes de la reacción, b) Hidrogel 50 %E, c) Hidrogel 75 %E, d) Hidrogel 100 %E (ensayo 7)

En la Tabla 5.14 se muestran los valores promedio de diámetro y su desviación estándar de cada muestra así como de las fibras antes de la reacción. Se observa que el diámetro de fibras de los hidrogeles es mayor que el de las fibras iniciales. Así como también aumentan con el porcentaje de entrecruzamiento, siendo de $469,0 \pm 13,7$ nm; $551,7 \pm 18,4$ nm; $633,6 \pm 28,1$ nm para los hidrogeles entrecruzados al 50%, 75% y 100%, respectivamente.



Se puede también comparar en la Tabla 5.14, la variación de la tasa de hinchamiento respecto al diámetro de las fibras de los hidrogeles. El hinchamiento disminuye con el porcentaje de entrecruzamiento mientras que el diámetro de las fibras de los hidrogeles aumenta. Esto nos revela que cuando un hidrogel está más entrecruzado, el diámetro de sus fibras es mayor y entonces los espacios existentes entre las fibras disminuyen.

Tabla 5.14. Efecto del porcentaje de entrecruzamiento (%E) sobre el diámetro de fibras de los hidrogeles obtenidos

Muestras	%E	Tasa hinchamiento (%)	Ø fibras antes reacción (nm)	Ø fibras hidrogel (nm)	Relación de Ø
2 (1)	50	494	396,6 \pm 15,8	469,0 \pm 13,7	1,18
2 (2)	75	976 ⁴		551,7 \pm 18,4	1,39
2 (3)	100	409		633,6 \pm 28,1	1,60

5.4.3. Angulo de contacto

Como se observó en el apartado 5.2.4, las fibras de PGGA son solubles en agua, impidiendo la medida del ángulo de contacto en dicho solvente. A diferencia de las muestras obtenidas de los hidrogeles donde se observó que absorben rápidamente el agua (Fig. 5.14, b) debido a su elevada tasa de hinchamiento, lo que impidió cuantificar el ángulo de contacto, así como también verificar el entrecruzamiento de los mismos.

Se intentó con otros disolventes más polares (hexano y etanol) pero debido a la tensión superficial de los mismos no se pudo realizar la medida.

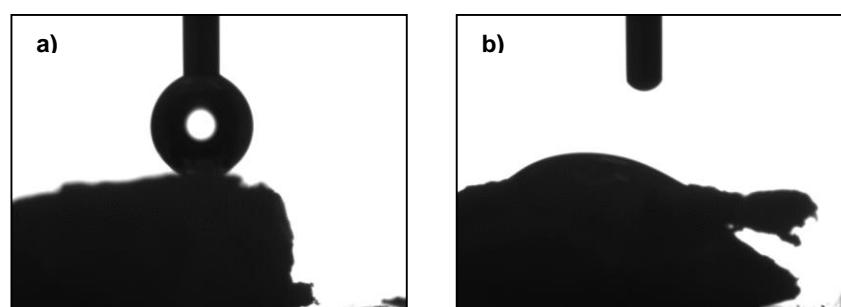


Fig. 5.14. Pruebas de medida de ángulo de contacto en el hidrogel que se obtiene después de la reacción de reticulación: a) imagen de OM, b) imagen de OM, gota de agua

⁴ Este valor queda fuera del intervalo de confianza de la tasa de hinchamiento porque tendría que estar situada entre 494 y 409.

absorbida muy rápidamente por el hidrogel

5.4.4. Análisis térmico

Se realizó un estudio térmico de las muestras entrecruzadas con diferentes porcentajes 50%, 75% y 100% con la finalidad de determinar si las propiedades térmicas se ven afectadas por este factor.

1. Análisis de calorimetría diferencial de barrido: DSC

En la figura 5.15 se observan las curvas de DSC correspondientes al primer calentamiento realizado a 20°C/min y enfriamiento del hidrogel realizado a 10 °C/min, para la muestra con un 100% de entrecruzamiento. En el primer barrido se observó una endoterma a 80.34°C correspondiente a la fusión de impurezas en el hidrogel, las cuales no se observan en barridos posteriores. La curva de enfriamiento (inset de la Fig. 5.15) permite determinar la temperatura de transición vítrea de -57.05°C.

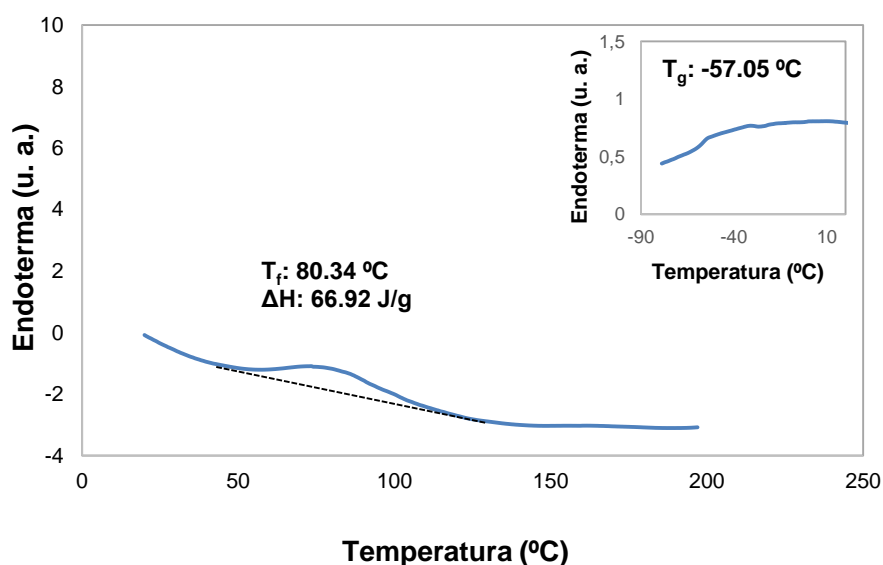


Fig. 5.15. Curva del primer barrido de DSC de la muestra de hidrogel 100%E e inset de la curva de enfriamiento.

En la Tabla 5.15 se resumen los resultados obtenidos para las tres muestras con diferente porcentaje de entrecruzamiento, donde se observa que a medida que la muestra está más entrecruzada la temperatura de fusión y la entalpia disminuyen. Así como la temperatura de



transición vítrea lo que era de esperarse ya que al estar más entrecruzado el hidrogel las cadenas de polímero tienen una menor movilidad.

Tabla 5.15. Parámetros calorimétricos de los diferentes hidrogeles entrecruzados

%E	T_f (°C)	ΔH (J/g)	T_g (°C)
50	95,62	121,6	-58,99
75	84,15	120,8	-56,08
100	80,34	66,9	-57,05

2. Análisis termogravimétrico: TGA

En cuanto a los resultados obtenidos a partir del TGA (Fig. 5.16) no se observó diferencia entre las muestras con diferentes porcentajes de entrecruzamiento. Para todos los casos se observó una pérdida inicial de peso de un 10 % a 93°C, que puede ser debida a restos de solvente o reactivos atrapados en el hidrogel. A 225°C se observa el inicio de la caída del peso hasta un 25 % a 600 °C. El 50% de degradación se alcanza a 324 °C.

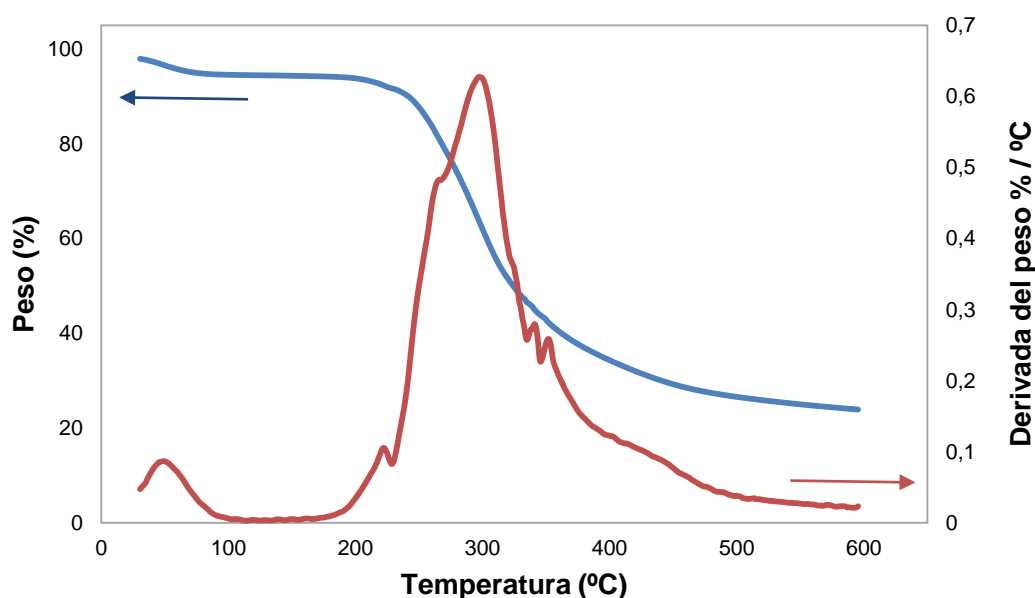


Fig. 5.16. Curvas de TGA de la muestra de hidrogel 100%E

5.4.5. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La reducida proporción de átomos de azufre que contienen las muestras de los hidrogeles impide verificar el porcentaje de entrecruzamiento. Además, la espectroscopia de FTIR no muestra diferencia entre las diferentes muestras, por ello se ha procedido a una caracterización de la superficie mediante la técnica de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS).

En la Fig. 5.17 se muestra el espectro de energía que se ha obtenido para la muestra del hidrogel entrecruzado teóricamente un 50%E donde se observan los picos correspondientes a los principales átomos que se encuentran en la muestra (C, O, N y S). Los valores corresponden a la excitación de electrones de dichos átomos. En la misma Figura se muestra una ampliación de las señales correspondientes a los átomos de C, O y N, no se muestran las señales debidas a átomos azufre ya que están en una proporción muy baja.

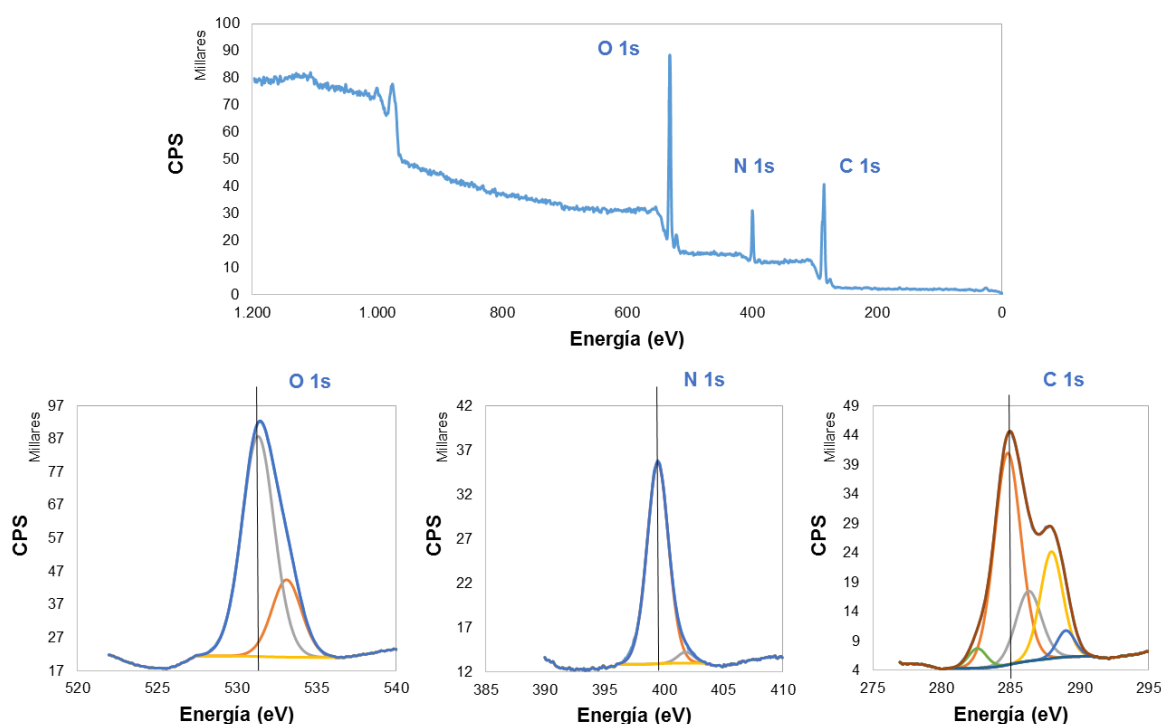


Fig. 5.17. Curvas de XPS de la muestra de hidrogel 50%E



La Tabla 5.16 indica los porcentajes relativos entre los elementos C, N, S y O que se han detectado en las muestras estudiadas, las cuales corresponden a las muestras con un menor y mayor porcentaje de entrecruzamiento (50%E y 100%E). En ambos casos, el porcentaje de átomos de azufre es bajo como era de esperarse, sin embargo para la muestra entrecruzada un 100% este valor equivale al doble de la muestra entrecruzada al 50%, siendo 0.32 y 0.12 respectivamente. Lo que indica que el entrecruzamiento se ha llevado a cabo para ambos casos en la relación adecuada.

Tabla 5.16. Datos obtenidos mediante XPS de las muestras de hidrogeles con diferente porcentaje de entrecruzamiento

Átomo	Energía (eV)	CPS ($\cdot 10^4$)	Concentración atómica (%)
Muestra: 50 %E			
S 2p	162	0,379	0,12
C 1s	286	3,95	59,71
N 1s	400	2,29	11,04
O 1s	530	7,09	29,13
Muestra: 100 %E			
S 2p	162	0,41	0,32
C 1s	286	4,02	62,79
N 1s	400	1,89	10,93
O 1s	530	5,74	25,95

5.4.6. Solubilidad de los hidrogeles

Se realizaron los ensayos para evaluar la solubilidad de los hidrogeles en diferentes disolventes. En la Tabla. 5.17 se puede observar los resultados obtenidos.

Los hidrogeles de PGGA obtenidos son insolubles en casi todos los disolventes excepto en TFA puro y en bicarbonato de sodio 0.5 M. Se usó el TFA para disolver el PGGA inicial, entonces es comprensible que el hidrogel se disuelva en este disolvente.

Tabla 5.17. Ensayos de solubilidad de los hidrogeles en diferentes disolventes

Solvente	Resultados
Agua	Insoluble
Ácido Dicloroacético	Insoluble

DCM	Insoluble
HFIP	Insoluble
HCl 3M	Insoluble
TFA	Soluble
TFA/NaCl 100 mM (50:50, v:v)	Insoluble
L-Glutamina/Agua (1:100, v:v)	Insoluble

5.4.7. Degradación de los hidrogeles

Los ensayos de degradación de hidrogel se efectuaron por triplicado y se evaluó el proceso de degradación mediante espectros de FTIR y medidas de la pérdida de peso.

La Fig. 5.18 muestra la aparición de una banda de número de onda alrededor de 1750 cm^{-1} que corresponde a una banda de vibración del enlace C=O de los ácidos carboxílicos. Esto demuestra que el hidrogel se ha degradado en presencia de la lipasa *Rhizopus oryzae*. Estos resultados demuestran que los hidrogeles de PGGA obtenidos son biodegradables.

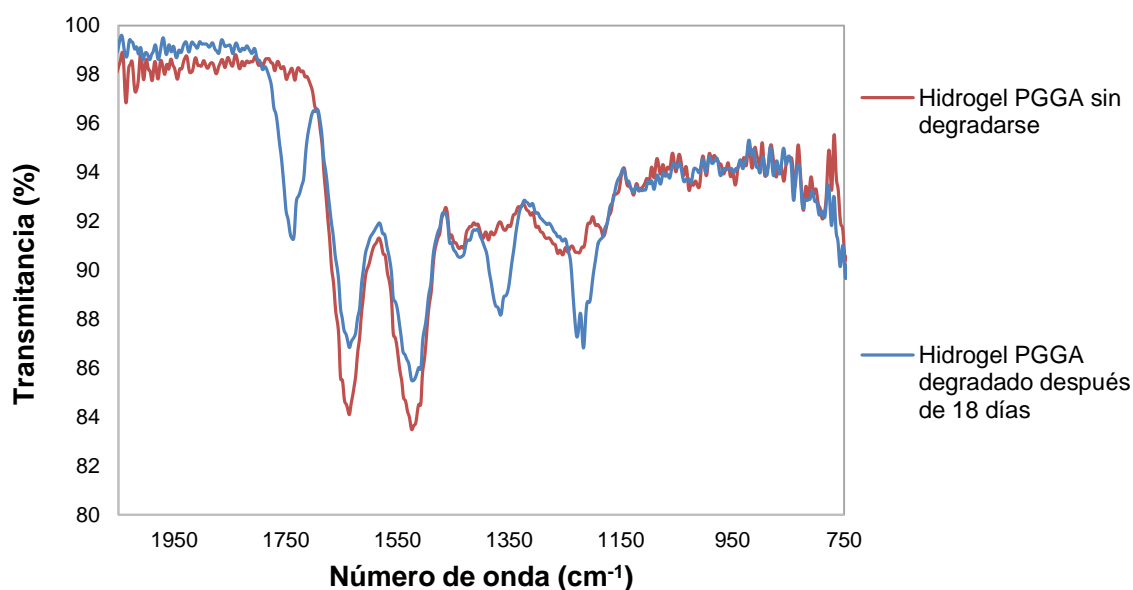


Fig. 5.18. Espectros FTIR de los hidrogeles de PGGA sin degradar (curva roja) y degradados después de 18 días (curva azul).



La Fig. 5.19 muestra una baja pérdida de peso a los 18 y 49 días de exposición para el PGGA, inferior al 4% en peso, debido a que la enzima (lipasa) es principalmente específica para hidrolizar los enlaces ésteres. De esta forma, mínimos cambios se pueden esperar para PGGA por lo que se recomienda para estudios posteriores emplear proteasas (e.g. quimiotripsina) capaces de degradar así mismo los enlaces amida de las unidades de aminoácidos.

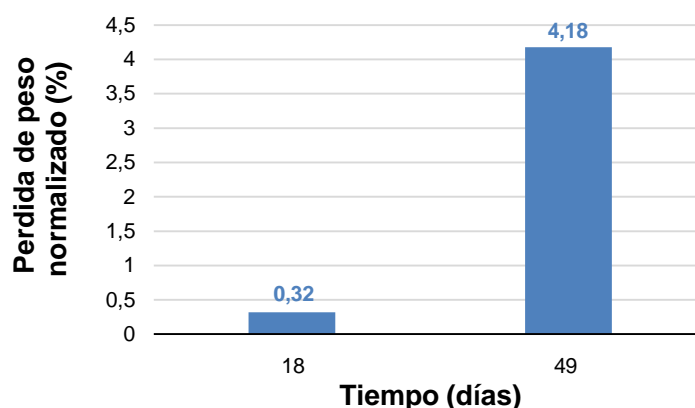


Fig. 5.19. Pérdida de peso en los hidrogeles de PGGA durante su degradación a los 18 y 49 días de exposición a la acción enzimática de la lipasa.

5.5. Ensayos biológicos

5.5.1. Liberación de bacteriófagos Fersisi desde el hidrogel

Con la finalidad de demostrar la actividad antibacteriana de los hidrogeles cargados con bacteriófagos Fersisi, se realizó el cultivo bacteriano de la bacteria *Staphylococcus aureus* en caldo de cultivo y en presencia de los hidrogeles de PGGA con un porcentaje de 100%E. Los resultados obtenidos de estos ensayos se muestran en la Fig. 5.20. Donde se representan el crecimiento relativo bacteriano en función del tiempo de cultivo.

En la Fig. 5.20, se puede observar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en las fases lag y de crecimiento exponencial (o fase logarítmica). La fase lag muestra una duración de 6 h y seguidamente se observa el inicio (cambio de pendiente de las curvas) de la fase de crecimiento exponencial, la misma que alcanza el máximo crecimiento alrededor de las 50 h de cultivo. Para el control se observa claramente que la fase de crecimiento estacionario (máximo crecimiento) ocurre transcurridas las 50 h de cultivo. Sin embargo, en el caso de la muestra de Fersisi sin hidrogel y los hidrogeles cargados con bacteriófagos se observó una disminución significativa del crecimiento bacteriano, correspondiente a una reducción

alrededor del 70% de la población bacteriana a las 50 h de cultivo.

Esta disminución de la población bacteriana después de alcanzar su máximo crecimiento, está claramente indicando la presencia de actividad lítica en las muestras cargadas con bacteriófagos. Es decir, los bacteriófagos cargados en el hidrogel fueron funcionalmente activos, y su actividad biológica es importante en el momento en que son capaces de inhibir en un 70% el crecimiento bacteriano.

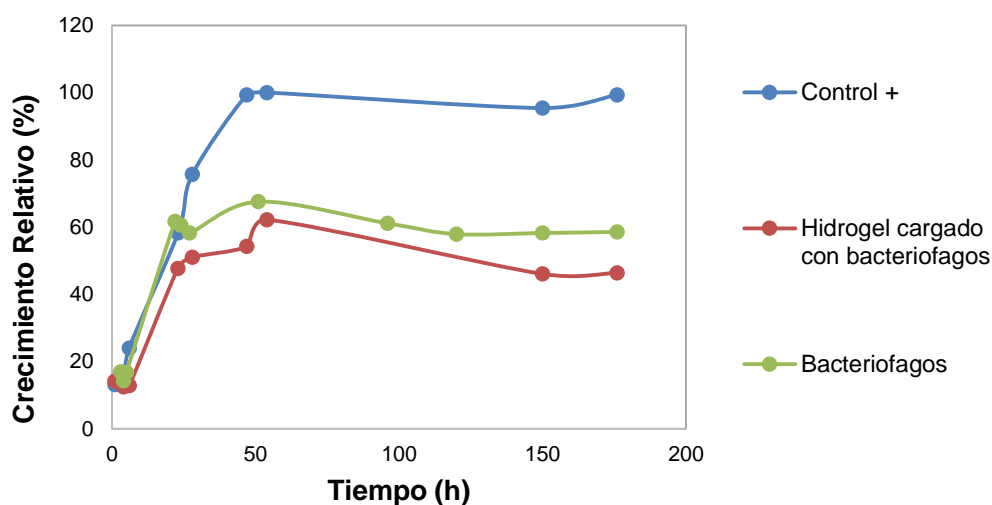


Fig. 5.20. Crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* en el caldo de cultivo: en presencia de un hidrogel cargado con bacteriófagos (curva roja), y en presencia de solo bacteriófagos (curva verde)

Se observó que luego de haber transcurrido un tiempo de contacto de 72 h del hidrogel cargado con bacteriófagos y el medio de cultivo con las bacterias, el mismo se había disuelto en su totalidad; sin embargo, su actividad lítica continua ya que los bacteriófagos quedan liberados en el medio. También se evaluaron los hidrogeles con un 50%E, y estos fueron disueltos al cabo de 24 h de contacto con los bacteriófagos, lo cual ocurre debido al menor entrecruzamiento. Finalmente, estos resultados indican que los bacteriófagos Fersisi podrían producir una degradación acelerada de los hidrogeles de PGGA. Como se observó en la Tabla 5.16 estos hidrogeles son insolubles en la mayoría de solventes orgánicos y los ensayos de degradación mostraron una degradación muy lenta menor al 5% transcurridos 49 días.



5.5.2. Liberación de drogas desde el hidrogel

Se estudió la liberación de las drogas (clorhexidina y polibiguanida) cargadas en los hidrogeles. El estudio de la liberación de las drogas fue realizado en tres medios de liberación diferentes: una solución tampón fosfato salino (PBS, pH 7.2-7.4), una mezcla de PBS y etanol absoluto (30:70 v/v) y finalmente en etanol absoluto. El primer caso se considera como un medio fisiológico con características de alta hidrofiliidad, mientras que el segundo corresponde a un medio hidrofóbico que podría favorecer una mayor liberación de las drogas debido a su mayor afinidad por interacciones hidrofóbicas no-polares.. La comparación de los perfiles de liberación en los dos medios es importante para indicar el mecanismo de liberación de la droga.

Las muestras de cada hidrogel cargadas con las drogas fueron pesadas antes de ser sumergidas en un frasco conteniendo 10 mL del medio correspondiente y se mantuvieron en agitación (100 rpm) a 37 °C. Los ensayos se efectuaron por triplicado, recogiendo 1 mL de muestra de liberación a diferentes intervalos de tiempo, y renovando el medio extraído. La cantidad final de la droga retenida en los hidrogeles se determinó sumergiendo el hidrogel en etanol absoluto.

Para determinar cuantitativamente la concentración de las drogas liberadas en los distintos medios, se procedió a su determinación mediante espectroscopia de absorción, midiendo la absorbancia a las longitudes de onda características de cada droga (261 y 236 nm para CHX y PHMB, respectivamente). Las concentraciones fueron determinadas de acuerdo a las correspondientes rectas de calibrado para CHX y PHMB (Fig. 5.21 y Fig. 5.22).

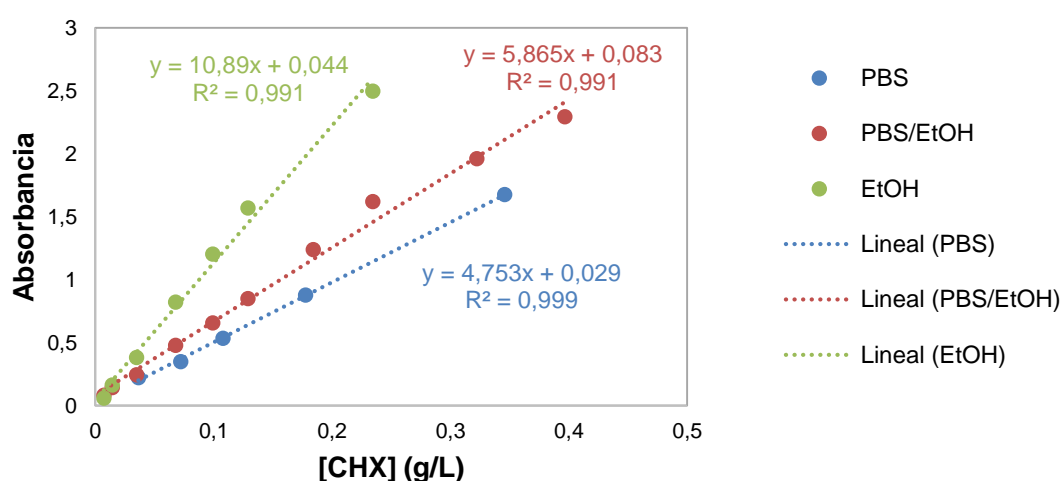


Fig. 5.21. Recta de calibrado de la droga clorhexidina digluconato (CHX) en tres medios distintos: PBS, PBS/ETOH (30:70) y EtOH

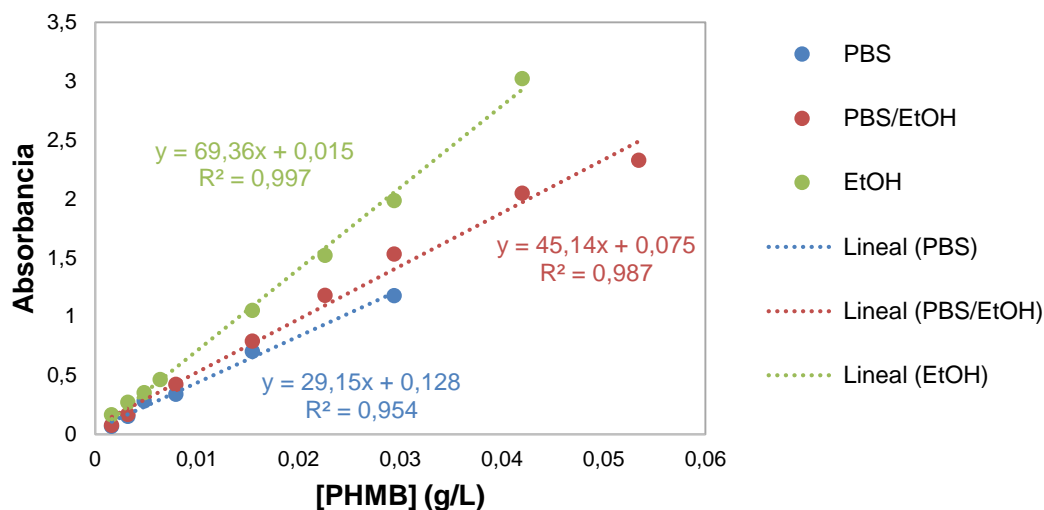


Fig. 5.22. Recta de calibrado de la droga poli(hexametenbiguanida) (PHMB) en tres medios distintos: PBS, PBS/ETOH (30:70) y EtOH

La Fig. 5.23 muestra la liberación de CHX en los tres medios de estudio, se puede observar que la liberación en el medio PBS está por debajo del 30% después de 96 h de liberación apreciándose en la curva un cierto efecto de saturación al efectuarse el proceso sin una renovación continua del medio. Puede también resaltarse que la liberación en el medio PBS/EtOH es acelerada liberando hasta un 70% del fármaco a 103 h. Finalmente se alcanzó una liberación máxima de 72% en el EtOH absoluto a 125 h (Tabla 5.16)



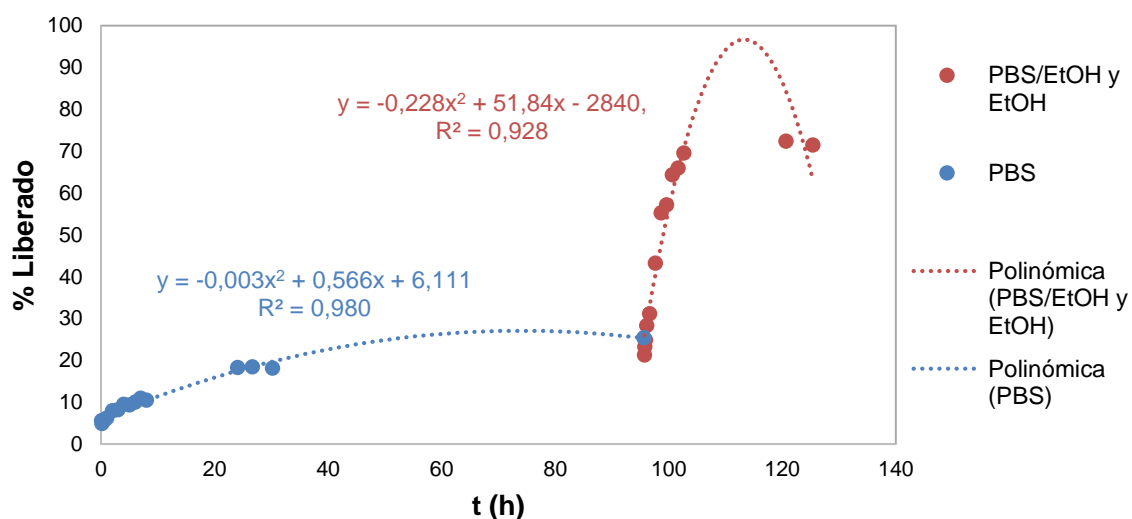


Fig. 5.23. Liberación de la clorhexidina digluconato (CHX) en tres medios distintos: PBS, PBS/ETOH (30:70) y EtOH

Para el caso del hidrogel cargado con PHMB (Fig. 5. 24) se observó una mayor liberación en PBS alcanzando un máximo de 72% al cabo de 96 h, y posteriormente se liberó en la mezcla de PBS/EtOH alcanzando un máximo de 92% a las 120 h. Finalmente se extrajo el máximo de fármaco en EtOH absoluto hasta un 93% a las 125 h (Tabla 5.18). La mayor liberación observada para el hidrogel cargado con PHMB se debe a la mayor afinidad de esta droga hidrofílica con el medio acuoso del PBS lo que favorece una liberación más acelerada.

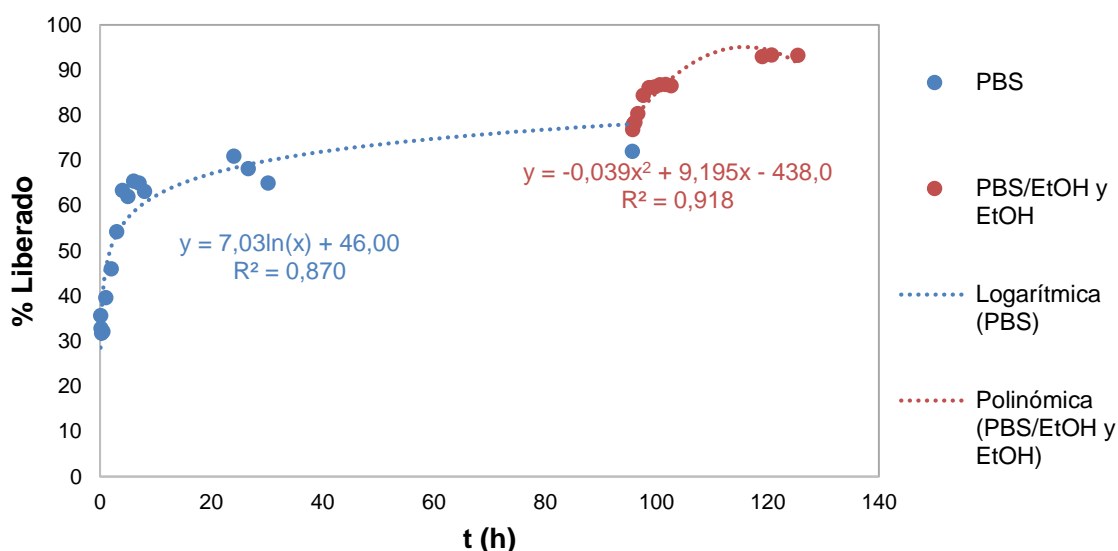


Fig. 5.24. Liberación de la poli(hexametilenbiguanida) (PHMB) en tres medios distintos: PBS, PBS/ETOH (30:70) y EtOH

Tabla 5.18. Porcentaje de liberación de las drogas CHX y PHMB en los diferentes medios

	Tiempo de liberación (h)	CHX 6,2% p/v	PHMB 1,5% p/v
% liberado en PBS	96h	25 %	72 %
% liberado en PBS/EtOH	103h	70 %	87 %
	120h	100 %	92 %
% liberado en EtOH	125h	72 %	93 %

Los resultados del análisis permiten deducir la capacidad de encapsulación de los hidrogeles, considerando la masa de la droga cargada en el hidrogel y el peso seco del hidrogel antes de cargar, multiplicado por la tasa de hinchamiento del hidrogel (Ec. 5.2):

$$\text{Capacidad de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Peso de fármaco cargado en el hidrogel}}{\text{Peso del hidrogel seco antes de cargar}} \times \text{tasa de hinchamiento} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

A partir de los datos obtenidos de la liberación, se determinó el peso de la droga incorporado en el hidrogel. Los resultados se resumen en la Tabla 5.19.

Tabla 5.19. Capacidad de encapsulación de CHX y PHMB en los hidrogeles

	CHX 6,2% p/v			PHMB 1,5% p/v		
Muestra	1	2	3	1	2	3
Peso hidrogel seco antes de cargar (mg)	15	5,6	12	22,9	14	2,3
Peso de fármaco cargado en el hidrogel (mg)	5,92	6,48	4,66	0,34	0,92	0,21
Peso de fármaco cargado/peso de hidrogel seco	0,39	1,16	0,39	0,015	0,065	0,090
Tasa de hinchamiento del hidrogel (%)	529%	654%	670%	480%	623%	1126%
Capacidad de encapsulación (%)	209%	756% ⁵	260%	7%	41%	101%
Promedio capacidad encapsulación (%)	234%			50%		



⁵ Este valor no fue utilizado para calcular el promedio de la capacidad de encapsulación



Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las siguientes afirmaciones:

a) La elevada tasa de hinchamiento de estos hidrogeles permite una elevada capacidad de encapsulación para ambas drogas, con la diferencia que el hidrogel cargado con PHMB se libera muy rápidamente en PBS, siendo mayor la retención de CHX en el hidrogel. Estos resultados ocurren de acuerdo con la hidrofobicidad de las drogas.

b) En ambos casos se obtuvo una alta capacidad de encapsulación de 234% y 50% para los hidrogeles cargados con CHX y PHMB respectivamente. Las diferencias observadas entre las dos drogas pueden deberse a la diferencia en el tamaño de la molécula ya que el CHX es una molécula hidrofóbica pero de bajo peso molecular, a diferencia del PHMB que es hidrofílica pero de mayor tamaño molecular (oligomero que contiene alrededor de 7 unidades de biguanida, tal como la CHX) y a pesar de ello tiene facilidad de difusión a través de las matrices de hidrogel.

5.5.3. Ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar

Como se indicó anteriormente, el ensayo de inhibición del crecimiento bacteriano en placas de agar fue realizado para observar de manera cualitativa la actividad antibacteriana de los hidrogeles cargados con las drogas y así complementar los resultados obtenidos de los ensayos de liberación.

El halo de inhibición es un indicativo de muerte bacteriana, mientras que las regiones más turbias del agar indican que el crecimiento bacteriano se está desarrollando con normalidad.

En la Fig. 5.25, se muestran las placas de agar obtenidas para los hidrogeles cargados con las dos drogas (CHX y PHMB). La inhibición es claramente observada por la formación de un halo translúcido alrededor del hidrogel cargado, siendo más evidente en el caso de las muestras cargadas con CHX, esto está relacionado con lo anteriormente observado durante la liberación, donde el hidrogel cargado con CHX tuvo una mayor capacidad de encapsulación así como también, inicialmente se cargó un mayor porcentaje de droga.

La imagen de la Fig 5.25 demuestra que las drogas cargados en los hidrogeles se difunden a través del agar y mantienen su actividad antibacteriana.

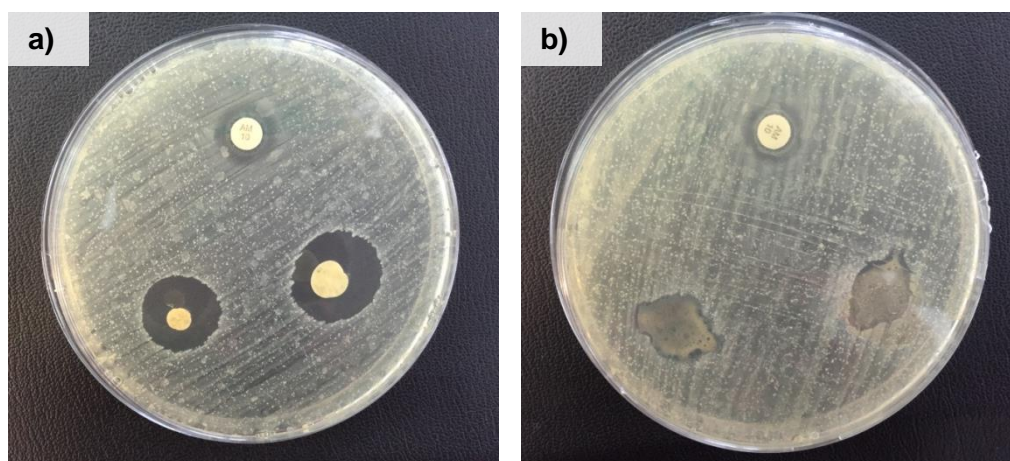


Fig. 5.25. Ensayo de la actividad antibacteriana de las drogas cargadas en los hidrogeles. a) hidrogeles cargados con la CHX, b) hidrogeles cargados con el PHMB

5.5.4. Adhesión celular

En general, los hidrogeles pueden ser usados como biomateriales implantables en órganos y tejidos humanos. Así, el objetivo de este ensayo es comprobar la biocompatibilidad de los hidrogeles preparados. Para ello, los hidrogeles fueron evaluados in-vitro en un sistema de cultivo de líneas celulares. Los ensayos de biocompatibilidad pueden ser extensos y diversos. En este proyecto se ha realizado una primera aproximación, para evaluar la biocompatibilidad de los hidrogeles preparados desde el punto de la adhesión celular evaluada a las 24 h desde la puesta en contacto de las células con los hidrogeles de PGGA...

Los resultados de la adhesión celular para las muestras de los hidrogeles de PGGA se muestran en la Fig 5.26.



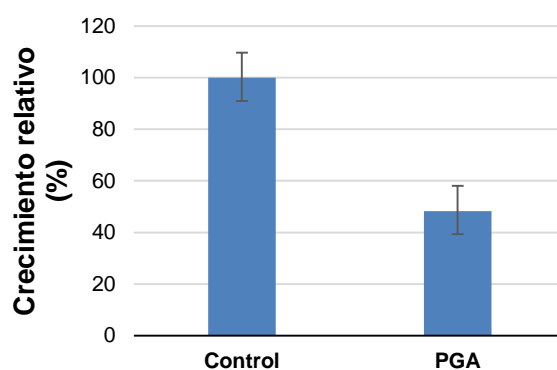


Fig. 5.26. Resultados de adhesión celular realizados con hidrogeles de PGGA

Los resultados demuestran que la viabilidad celular ocurre en los hidrogeles de PGGA, sin embargo, los resultados indican un bajo porcentaje de viabilidad. Esto puede deberse a causa de la elevada reticulación del hidrogel, lo cual impide que algunos subproductos puedan ser eliminados de la matriz y quedaran retenidos. Esto fue evidenciado por el cambio del pH del medio de cultivo hacia el ácido, lo cual indicaría la liberación del ácido γ -glutámico. A pesar de estos resultados, estos hidrogeles son biomateriales prometedores puesto que pueden ser mejorables en su procesado para eliminar restos de los productos usados en su preparación.

6. Conclusiones

El objetivo principal de este proyecto era el desarrollo de matrices de nanofibras de PGGA entrecruzadas covalentemente para que se comporten como hidrogeles estables, y permitir que sean cargadas en disoluciones de drogas antibacterianas, tal como, la CHX y el PHMB. Además, se quería cargar estas matrices con un coctel de bacteriófagos específicos contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Una vez finalizado el trabajo, el análisis de los resultados obtenidos permite llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se ha conseguido optimizar la técnica de electrospinning para obtener nanofibras de PGGA, a partir de disoluciones poliméricas de este mismo en TFA.
2. Se ha observado que los diferentes parámetros que intervienen en las propiedades de la disolución polimérica influyen en la obtención de fibras:
 - a. Los solventes con una carga eléctrica baja no permiten obtener fibras. El TFA fue el único solvente capaz de disolver el PGGA y formar nanofibras mediante la técnica del electrospinning.
 - b. Existe solamente una cierta fracción de PGGA que se disuelve en el TFA, y es esta la que se utiliza para hacer el electrospinning.
 - c. La concentración del PGGA en TFA altera mucho la morfología y el diámetro de las fibras obtenidas: a mayor concentración de PGGA, mayor diámetro de las fibras. La concentración óptima de polímero es 8%-wt en TFA.
3. En cuanto al proceso de entrecruzamiento de las fibras, diferentes conclusiones fueron hechas a lo largo de los distinguidos ensayos:
 - a. Las fibras de PGGA se disuelven en metanol, sin embargo, la cistamina (reactivo de reticulación) no se disuelve en metanol. Entonces, el sistema óptimo para llevar a cabo la segunda etapa de la reacción de reticulación es: utilizar como disolvente una mezcla MetOH/EtOH (35:65 v/v) y dejar reaccionar durante solamente 6h.
 - b. Las matrices de fibras obtenidas en el electrospinning fueron muy finas para llevar a cabo su entrecruzamiento. Así que la forma óptima para realizar la reacción es: apilar muchas capas de fibras y sellar sus bordes mediante de un banco Kofler.
4. La reacción de reticulación permitió obtener hidrogeles con diferentes porcentajes de

entrecruzamiento: 50%E, 75 %E y 100 %E.

5. Se ha obtenido hidrogeles de PGGA que :

- a. Tienen un hinchamiento el cual disminuye con el porcentaje de entrecruzamiento mientras que el diámetro de las fibras de los hidrogeles aumenta.
- b. Tienen una temperatura de fusión que disminuye a medida que están más entrecruzados. Su temperatura de degradación térmica es de 225°C.
- c. Tienen un porcentaje de átomos de azufre que doble con su porcentaje de entrecruzamiento.
- d. Tienen una capacidad de degradación larga en el tiempo: pierden menos de 4% de su peso a los 49 días de estar esposados con una enzima

6. Los bacteriófagos pueden ser liberados por difusión desde el hidrogel de PGGA, manteniendo su actividad lítica o antibacteriana. Esta actividad fue demostrada cuantitativamente por la inhibición del crecimiento bacteriano en caldo de cultivo en presencia de los hidrogeles cargados con los bacteriófagos.

7. Los hidrogeles pueden cargarse efectivamente con las drogas CHX y PHMB. Tienen una capacidad de encapsulación de CHX y PHMB respectivamente de 234% y 50%. El hidrogel libera hasta un 72% para la CHX y un 93% para el PHMB después de 125h en medios de liberación.

8. Los hidrogeles cargados con biofármacos tienen una actividad antibacteriana. Esto fue establecido cualitativamente por la inhibición del crecimiento bacteriano en placa de agar.

9. Por fin, los hidrogeles de PGGA son compatibles con las células in-vitro y permiten una viabilidad celular reducida cuando no se eliminan totalmente los productos utilizados en su síntesis.

7. Estudio de sostenibilidad del proyecto

7.1. Impacto ambiental

Los objetivos de este apartado son los de identificar qué tipo de efectos puede tener el desarrollo de este proyecto para la salud y el medio ambiente. Para ello, se han considerado los distintos productos químicos que se emplean en la parte experimental del proyecto con la idea de evaluar qué efectos adversos pueden tener.

En la Tabla. 7.1 se pueden observar los diferentes reactivos químicos utilizados con su clase y pictogramas de peligro. Para identificar cual clase de peligro corresponde a cada reactivo, se utilizó las fichas de seguridad. De hecho, estas fichas recogen la información necesaria sobre estos productos e informan al usuario sobre el tipo de peligro al que pueden estar sometidos tras una manipulación incorrecta.

Las clases de peligro refieren a las *Hazard Statements* del reglamento (CE) n°1272/2008 que están explicadas en la tabla de la Tabla. 7.2.

Tabla 7.1. Clase y pictogramas de peligro de los reactivos químicos involucrados en este proyecto

Reactivo	Clase de peligro	Pictogramas
Cistamina	H302	
EDC	H302, H312, H332, H315, H319, H335	
Etanol	H225	
Metanol	H225, H331, H311, H301, H370	
TFA	H332, H314, H412	
Biofármaco CHX	H400, H411	
Biofármaco PHMB	H302, H315, H319, H332, H335	

Tabla 7.2. Significado de los *Hazard Statements* referentes a los reactivos químicos utilizados

Indicaciones de peligro	
H225	Líquidos inflamables
H301	Tóxico en caso de ingestión
H302	Nocivo en caso de ingestión
H311	Tóxico en contacto con la piel
H312	Nocivo en contacto con la piel
H314	Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves
H315	Provoca irritación cutánea
H319	Irritación ocular grave
H331	Tóxico en caso de inhalación
H332	Nocivo en caso de inhalación
H335	Puede irritar las vías respiratorias
H370	Provoca daños en los órganos
H400	Muy tóxico para los organismos acuáticos
H411	Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos
H412	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

Para la elaboración de este proyecto, se ha trabajado con reactivos que pueden ser potencialmente peligrosos (mayormente los disolventes) y que deben manipularse con especial cuidado.

A lo largo de este proyecto, se ha también trabajado con un polímero biodegradable: el PGGA. Este tipo de material no va a tener consecuencias graves para el medio ambiente. De hecho, son sustancias no nocivas para el medio ambiente y la salud.

En relación con el tratamiento de los residuos que se generan en el laboratorio PSEP de la ETSEIB, la empresa ECOCAT en colaboración con el Centro de Sostenibilidad Territorial se encarga de estos. Existen unos contenedores específicos donde deben depositarse estas sustancias una vez utilizadas en el laboratorio para poder proceder a su tratamiento y evitar la contaminación de medio ambiente.

7.2. Evaluación económica

En este apartado se han considerado los costes de los reactivos, equipos y personal para

evaluar la viabilidad del proyecto. De hecho, la evaluación económica es importante y necesaria para poder tomar decisiones respecto la viabilidad del proyecto.

7.2.1. Coste de reactivos y disolventes

A continuación en la Tabla. 7.3, se puede observar los costes de los reactivos químicos y disolventes necesarios para la elaboración de las nanofibras, la realización de la reacción de reticulación y para los ensayos biológicos también.

Tabla 7.3. Coste de los reactivos químicos y disolventes utilizados en este proyecto

Coste de disolventes y reactivos			
Disolventes	Cantidad	Precio unidad (€)	Coste (€)
Agua	1L	0,3	0,3
Etanol	1L	34,04	34,04
Metanol	1L	57,7	57,7
TFA	300mL	63,9	191,7
Reactivos químicos	Cantidad	Precio unidad (€)	Coste (€)
Cistamina	25g	29,9	29,9
EDC	10g	172,5	172,5
PGGA	10g	300€ para 50g	60
Reactivos biológicos	Cantidad	Precio unidad (€)	Coste (€)
Bacteriófagos Phagestaph	20mL	88	88
Biofármaco CHX	5 mL	33€ para 25 mL	6,6
TOTAL			640,74 €

El coste total de los productos químicos es de 640,74 €.

7.2.2. Coste de los equipos de laboratorio

Para contabilizar los costes de los equipos de laboratorio utilizados, se ha considerado la amortización de los equipos, el número de usuarios que comparte el aparato, un interés anual (i) del 3% y la duración del proyecto (4 meses).

La anualidad y el coste de cada equipo se calculan de la manera siguiente:

$$Anualidad = P \times \frac{i \times (1+i)^n}{(1+i)^n - 1} \quad (\text{Ec. 7.5})$$

$$Coste = \frac{Anualidad}{n^{\circ}usuarios} \times \frac{n^{\circ}meses}{12} \quad (\text{Ec. 7.2})$$

Tabla 7.4. Coste de los equipos de laboratorio utilizados para este proyecto

Coste de los equipos de laboratorio					
Equipo	Precio de adquisición (€)	Amortización (años)	Anualidad (€/año)	Nº usuarios	Coste (€)
Centrifuga	1877	2,5	790,32	4	65,86
Electrospinning	3000	5	655,06	4	54,59
MO con cámara digital	19800	10	2321,16	10	77,37
SEM	210000	20	14115,30	15	313,67
FTIR	24000	10	2813,53	10	93,78
Angulo de contacto	3500	10	410,31	10	13,68
Lector ELISA	3440	5	751,14	10	25,04
UV-Vis	12000	10	1406,77	10	46,89
DSC	62000	10	7268,29	15	161,52
TGA	50000	10	5861,53	15	130,26
XPS	300000	20	20164,71	15	448,10
TOTAL					1 430,76 €

7.2.3. Coste personal

Para calcular el coste personal, se toman en cuenta las horas dedicadas a cada parte del proyecto. El número total de horas de trabajo en el laboratorio es de 565 horas.

Tabla 7.5. Coste personal para realizar este proyecto

Coste personal			
Actividad	Duración (h)	Precio (€/h)	Total (€)
Estudio previo y documentación	75	10	750
Experimentación	100	10	1000
Análisis de resultados	130	10	1300
Redacción del informe	260	10	2600
TOTAL			5 650€

7.2.4. Coste total del proyecto

Para calcular el coste total del presupuesto de actividad (Tabla 7.6), se han considerado los costes anteriormente calculados.

Tabla 7.6. Presupuestos de actividad

Presupuesto de actividad	
	Total (€)
Coste de disolventes y reactivos	640,74
Coste de equipos	1430,76
Coste de personal	5650
TOTAL	7 721,50 €

Después, se añaden los suministros de agua y electricidad, calculados como un 10% del presupuesto de actividad. Otros costes como posibles imprevistos y el coste operacional del laboratorio (*overhead*) son considerados como un 3% y un 21% del presupuesto total respectivamente. Todos estos costes adicionales se pueden observar en la Tabla 7.7, conjuntamente con el presupuesto final del proyecto.

Tabla. 7.7. Presupuesto del proyecto

Presupuesto del proyecto	
	Total (€)
Presupuesto de actividad (PA)	7721,50
Suministros de agua y electricidad (10% PA)	772,15
Subtotal del proyecto	8493,65
Imprevistos (3% subtotal del proyecto)	254,81
Coste operacional (21% subtotal del proyecto)	1783,67
TOTAL	10 532,13 €

Finalmente, el presupuesto total de este proyecto asciende a 10 532,13 €.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, el Dr. Jordi Puiggalí y el Dr. Luis Javier del Valle, todos los conocimientos que me han transmitido, su paciencia, y toda la dedicación que han puesto para que este proyecto salga adelante. Sin ellos este proyecto no hubiera sido posible.

También quisiera agradecer la Dra. Angélica Díaz, la cual me ayudo durante todos estos meses, tanto en la experimentación como en el análisis de resultados.

Por otro lado, quiero agradecer a todo el equipo del Laboratorio PSEP del Departamento de Ingeniería Química por la ayuda prestada.

Gracias también a todos mis amigos por levantarme el ánimo y por todos los momentos compartidos.

Por último, me gustaría dar las gracias a toda mi familia en Francia. Gracias a mis abuelos por todos los momentos compartidos y las alegrías que me han ofrecido a lo largo de la vida. Gracias a mi madre por todos los esfuerzos que ha realizado para mí, y por haberme enseñado que uno tiene que luchar para conseguir sus metas. Y gracias a mi hermana por cuidarme desde pequeña y por haberme ayudado siempre en los momentos difíciles. Sin vosotros nunca hubiera llegado a ser lo que soy.

Bibliografía

- [1] PUIGGALÍ, J., *Estructura y propiedades de los polímeros*. CPDA, ETSEIB, 2009.
- [2] CHANDRA, R., RUSTGI, R., *Biodegradable polymers*. Progress in Polymer Science, Vol. 23, 1998, p. 1273-1335.
- [3] OGUNLEYE, A., BHAT, A., IRORERE, V. U., HILL, D., WILLIAMS, C., RADECKA, I. *Poly- γ -glutamic acid: production, property and applications*. Microbiology, Vol.161, 2015, p. 1-17.
- [4] WAKO PRODUCT UPDATE No.13, *Higher Molecular Weight Polymer Isolated from a Fermented Soybean Food Poly- γ -Glutamic*, Biochemistry, p. 7.
- [5] FLEISCHER RADU, J. E., NOVAK, L., HARTMANN, J. F., BEHESHTI, N., KJONIKSEN, A.-L., NYSTRÖM, B., BORBELY, J., *Structural and dynamical characterization of poly-gamma-glutamic acid-based cross-linked nanoparticles*. Colloid Polymer Sci, Vol. 286, 2008, p. 365-376.
- [6] RAJESH, V., DHIRENDRA, S. R., *Nanofibers and their applications in tissue engineering*. International Journal of Nanomedicine, Vol. 1, p. 15-30.
- [7] HUANG, Z.-M., ZHANG, Y.-Z., KOTAKI, M., RAMAKRISHNA, S., *A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites*. Composites Science and Technology, Vol. 63, 2003, p. 2223-2253.
- [8] FRENOT, A., CHRONAKIS, I.S., *Polymer nanofibers assembled by electrospinning*. Current Opinion in Colloid and Interface Science, Vol.8, 2003, p. 64-75.
- [9] LI, D., XIA, Y., *Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?*, Advanced Materials, Vol.16, 2004, p. 1151-1170.
- [10] ROBLES GARCIA, M. A., RODRIGUEZ FELIX, F., MARQUEZ RIOS, E., BARRERA RODRIGUEZ, A., AGUILAR MARTINEZ, J., DEL TORO SANCHEZ, C.L., *Aplicaciones biomédicas, textiles y alimentarias de nano estructuras elaboradas por electrohilado*. Biotécnica, Vol. 16 No. 2, 2014, p. 44-52.
- [11] TUCKER, N., STANGER, J., STAIGER, M., RAZZAQ, H., HOFMAN, K., *The History of the Science and Technology of Electrospinning from 1600 to 1995*. Journal of Engineered Fibers and Fabrics, 2012, p. 63-73.
- [12] BHARDWAJ, N., KUNDU, S. C., *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication*

technique. Biotechnology Advances, Vol. 28, 2010, p. 325-347.

- [13] HOHMAN, M. M., SHIN, M., RUTLEDGE, G., BRENNER, M. P., *Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory*. Physics of Fluids, Vol. 13, 2001, p. 2201-2220.
- [14] SENCADAS, V., CORREIA, D.M., AREIAS, A., BOTELHO, G., FONSECA, A.M., NEVES, I.C., GOMEZ RIBELLES, I.C., MENDEZ, S.L., *Determination of the parameters affecting electrospun chitosan fiber size distribution and morphology*. Carbohydrate Polymers, Vol. 87, 2012, p. 1295-1301.
- [15] DEITZEL, J.M., KLEINMEYER, J., HARRIS, D., BECK TAN, N.C., *The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles*. Polymer, Vol. 42, 2001, p. 261-272.
- [16] MATSUSAKI, M., YOSHIDA, H., AKASHI, M., *The construction of 3D-engineered tissues composed of cells and extracellular matrices by hydrogel template approach*. Biomaterials, Vol. 28, 2007, p. 2729-2737.
- [17] YOSHIDA, H., KLINKHAMMER, K., MATSUSAKI, M., MOLLER, M., KLEE, D., AKASHI, M., *Disulfide-Crosslinked Electrospun Poly(γ -glutamic acid) Nonwovens as Reduction-Responsive Scaffolds*. Macromolecular Bioscience, Vol. 9, 2009, p. 568-574.
- [18] WANG, S., CAO, X., SHEN, M., GUO, R., BANYAI, I., SHI, X., *Fabrication and morphology control of electrospun poly(γ -glutamic acid) nanofibers for biomedical applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 89, 2012, p. 254-264.
- [19] DE LA ROSA, A., *Matrices biodegradables con actividad antibacteriana*, Memoria final de Master, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona, 2014, p. 30.
- [20] DUBLANCHET, A., PATEY, O., *The phage therapy: Past and future (new facts and procedure[s] for a rehabilitation)*. Immuno-analyse et biologie spécialisée, Vol. 26, 2011, p. 165-175.
- [21] DUBLANCHET, A., FRUCIANO, E., *A short history of phage therapy*. Médecine et maladies infectieuses, Vol. 38, 2008, p. 415-420.

